Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux ultramafiques néo-calédoniens

Charly Zongo

▶ **To cite this version:**

Charly Zongo. Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux ultramafiques néo-calédoniens. Biologie végétale. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2010. Français. NNT : 2010NCAL0029 . tel-02975933

HAL Id: tel-02975933
https://unc.hal.science/tel-02975933

Submitted on 23 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale : Milieux Insulaires Ultra-Marins

THESE

Présentée par

ZONGO Charly

Pour obtenir le grade de
Docteur es Sciences de l'Université de la Nouvelle-Calédonie
Spécialité : Biologie et physiologie végétales appliquées

Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux ultramafiques néo-calédoniens

Thèse dirigée par FOGLIANI Bruno, MCF, HDR
et co-dirigée par BOURAÏMA-MADJEBI Saliou, Pr.

Soutenue publiquement le 16 Juillet 2010 devant le jury composé de :

CORBINEAU, F., Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
ECHEVARRIA, G., Professeur, Université de Nancy	Rapporteur
BASKIN, C., Professor, University of Kentucky	Examinateur
JOB, D., Professeur, Laboratoire mixte CNRS / Bayer Crop Science	Examinateur
RABIER, J., MCF HDR, Université de Provence	Examinateur
L'HUILLIER, L., Chercheur, Institut agronomique Néo-Calédonien	Examinateur
FOGLIANI, B., MCF HDR, Université de la Nouvelle-Calédonie	Directeur de thèse

DOI:10.6098/2010NCAL0029

A mes parents, à qui je dois tout et sans qui rien ne serait possible, pour leur soutien sans faille dans tous ce que j'ai pu entreprendre

Et

A mon pays, que l'aboutissement de cet ouvrage soit le signe qu'ensemble, main dans la main, la construction du pays et du destin commun est possible.

Case de la Grande chefferie du district de Wet-Lifou

« Le passé a été le temps de la colonisation.
Le présent est le temps du partage, par le rééquilibrage.
L'avenir doit être le temps de l'identité, dans un destin commun. »

Extrait du Préambule de l'Accord de Nouméa

AVANT-PROPOS

Cette thèse se veut le résultat d'une collaboration entre de nombreuses équipes de recherche appartenant à plusieurs laboratoires qui ont mis à ma disposition leurs capacités matérielles et humaines avec en tout premier lieu, le Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (L.I.V.E.) de l'Université de la Nouvelle-Calédonie à l'origine de ce sujet de thèse. Au sein du L.I.V.E., dirigé par le professeur H. Amir, la majeure partie du travail a été effectuée sous la direction du Dr. B. Fogliani, qui par ses conseils, son expérience scientifique et technique et son implication sans demi-mesure à ces travaux de recherches, a permis la concrétisation de ce beau projet.

Les autres partenaires sont divers et chacun a joué un rôle en fonction de la thématique concernée :

- L'Equipe Biomarqueurs et Bioindicateurs Environnementaux UMR IMEP 6116 CNRS IRD de l'Université de Provence. Le Dr. Jacques Rabier a par ses conseils et son expérience permis une étude par microscopie électronique à balayage de qualité. L'accueil et les conseils scientifiques de toute l'équipe pendant un mois de stage ont été très enrichissant et ont permis une évolution conséquente de mes travaux de recherches et notamment dans la répartition des éléments minéraux au sein des graines étudiées.
- L'Equipe AD2EM de l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2), Université Paul Cézanne (Aix-Marseille IIII), UMR CNRS 6263. Le Dr I. Bombarda par ses compétences dans le domaine, entre autres, d'étude des acides gras a permis l'identification d'une série d'omega 5 très originaux et une avancée non négligeable dans la caractérisation des réserves séminales des espèces de Nouvelle-Calédonie.
- Le Laboratoire joint CNRS / UCBL / INSA / Bayer CropScience-UMR5240 de Lyon. Les expériences scientifiques et techniques du Pr. D. Job et de Mme C. Job dans le domaine de la protéomique m'ont permis d'appréhender avec intérêt ce domaine de recherche. Ils m'ont ouvert leur laboratoire pendant près de 3 mois et ont permis un essor considérable dans la compréhension des mécanismes de tolérance au nickel développés par les semences de *Psychotria douarrei*. Le Pr. D. Job et son équipe ont pris en charge toutes les analyses protéomiques, de la réalisation des gels 2-DE, jusqu'à l'identification en spectrométrie de masse des protéines effectuées par Jean-Marc Strub et Alain Van Dorsselaer (CNRS, Strasbourg).

- Le Laboratoire de Physiologie Végétale Appliqué de l'Université Paris VI dans lequel j'ai pu effectuer un stage d'un mois accompagné par le Pr. F. Corbineau et le Pr. C. Bailly. Leurs conseils m'ont permis de ne pas m'éparpiller de mon sujet initial et d'avancer au mieux dans cette voie.
- "L'Institute of Natural Resources, College of Sciences" de l'Université de Massey en Nouvelle-Zélande. Mr. Craig McGill m'a accueilli pendant 3 semaines de stage pour la réalisation d'une étude microscopique par microscopie électronique à transmission.
- Le Centre de Recherche sur l'Ecologie des Semences de l'institut agronomique néo-Calédonien. Les échanges fructueux avec le Dr Laurent L'Huillier, et son équipe, qui par ses qualités scientifiques et sa vision de l'intérêt des semences de Nouvelle-Calédonie dans la restauration écologique des écosystèmes néo-calédoniens ont permis des avancés considérables de ce domaine de recherche.

Enfin, ce projet n'aurait pu voir le jour sans le soutien financier de la Province Sud qui m'a octroyé un Prix d'Encouragement à la Recherche et celui de l'entreprise Koniambo Nickel SAS (KNS) dans le cadre d'une convention de recherche impliquant l'étude de la germination et de la conservation de graines du projet de l'Usine du Nord utilisées en revégétalisation.

Grace à la participation de chacun, ce travail a pu aboutir à de nombreux résultats qui sont ou seront valorisés prochainement. C'est ainsi que 5 publications (1 acceptée, 2 soumises, 2 en préparation) et un chapitre d'ouvrage permettront une large diffusion scientifique, tout comme les 10 communications à des conférences nationales et internationales. Ces dernières ont permis par ailleurs de développer des relations avec des chercheurs spécialisés dans le domaine qui se réuniront durant 4 jours au mois de juillet en Nouvelle-Calédonie pour la réalisation d'un workshop dédié aux graines.

Publications et chapitre d'ouvrage :

Bombarda, I., Zongo, C., McGil, C.R., Doumenq, P., Fogliani, B., 2010. Fatty acids composition of the seeds of *Alphitonia neocaledonica* and *Grevillea exul var. rubiginosa*, occurrence of an ω5-monoene fatty acid series. Journal of American Oil chemist's society. In press

L'Huillier L., Fogliani B., Wulff A., Zongo C., La restauration des sites miniers. In : L'Huillier L., Jaffre T., Wulff A., Mine et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. IAC Editions, Nouvelle-Calédonie. In press,

Zongo, C., McGill C.R., Saintpierre-Bonaccio, D., L'Huillier, L., Fogliani, B., 2010. Structure and biology of *Alphitonia neocaledonica* seeds used for ultramafic soil revegetation in New Caledonia. Forest ecology and management. Soumis

Zongo, C., Tiavouane, J., Henriot, L., Fogliani, B., 2010. Detailed analysis of Cyperaceae seeds used for mining sites revegetation in New Caledonia: the case of *Gahnia aspera*. Ecological restoration. Soumis

Fogliani, B., Rabier, J., Zongo, C., Laffont-Schwob, I., Notonier, R., Bouraïma-Madjèbi, S., 2008. Comparison of minerals distribution in seeds of two new Caledonian *Psychotria* species including the metal hyperaccumulator *P. Douarrei.* In prep.

Zongo, C., Job, C., Le Pessot, L., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A., Job, D., Fogliani, B., 2010. Proteome wide analysis of *Psychotria douarrei* seeds reveals novel mechanisms of Nickel hyperaccumulation in endemic plants of New-Caledonia. In prep.

Communications à des conférences nationales ou internationales :

Saintpierre-Bonaccio, D., Zongo, C., McGill, C.R., Bouraïma-Madjèbi, S., Fogliani, B., 2007. Biology, structure, and germination characteristics of kùa seeds (*Alphitonia neocaledonica*, Rhamnaceae) used for re-vegetation in New Caledonia. In: Conference Proceedings "Seed ecology II, the 2nd International Society for Seed Science Meeting on Seeds and the Environment". Eds: Turner, S., Merritt, S., Clarke, L., Commander, L., Dixon, K. Perth, Western Autralia, 9-13 september, 77. (Poster)

Zongo, C., Saintpierre-Bonaccio, D., McGill, C.R., Bouraïma-Madjèbi, S., Hnawia, E., Fogliani, B., 2007. Lipid contents and fatty acids composition of seed storage reserves of eight species used for re-vegetation in New Caledonia and their implication for long term conservation. In: Conference Proceedings "Seed ecology II, the 2nd International Society for Seed Science Meeting on Seeds and the Environment". Eds: Turner, S., Merritt, S., Clarke, L., Commander, L., Dixon, K. Perth, Western Autralia, 9-13 september, 104. (Poster)

Fogliani, B., Rabier, J., Zongo, C., Bouraïma-Madjèbi, S., 2007. Nickel and calcium localisation in fruit and seed of the metal hyperaccumulator *Psychotria douarrei* from New Caledonia. In: Conference Proceedings "Seed ecology II, the 2nd International Society for Seed Science Meeting on Seeds and the Environment". Eds: Turner, S., Merritt, S., Clarke, L., Commander, L., Dixon, K. Perth, Western Autralia, 9-13 september, 23. (Poster)

Zongo, C., Fogliani, B., McGill, C.R., Saintpierre-Bonaccio, D., Bouraïma-Madjèbi, S., 2008. Morphological adaptations and chemical composition of seeds of New Caledonian native plants used for mining revegetation. In: Polish Journal of Natural Sciences Supplement No. 5/2008 "9th ISSS Conference on SEED BIOLOGY. Olsztyn, Poland, 6-11 July, p.106. (Communication orale)

Zongo, C., Fogliani, B., Rabier, J., Laffont-Schwob, I., Saintpierre, D., Bouraïma-Madjèbi, S., 2008. Nickel and calcium localisation in fruit and seed of the metal hyperaccumulator *Geissois pruinosa* versus the non hyperaccumulator *G. montana*. Sixth International Conference on Serpentine Ecology, College of the Atlantic Bar Harbor, USA, 16-23 July. (Poster)

Zongo, C., Fogliani, B., Bombarda, I., McGill, CR., Doumenq, P., 2008. Chemical composition of seeds from two New Caledonian plants used for revegetation: Identification of unusual isomers of C14:1, C16:1 and C18:1 in their oil. Seeds for Futures symposium, Massey University, Palmerston North, New Zealand, 26-27 November. (Poster)

Zongo, C., Fogliani, B., Rabier, J., Bombarda, I., McGill, C.R., 2009. De l'étude approfondie des semences de plantes natives candidates à la restauration écologique et de leur intérêt primordial dans la conservation de la biodiversité végétale néo-calédonienne. 11ème Inter-congrès des Sciences du Pacifique et 2emes Assises de la Recherche française dans le Pacifique, Tahiti – Polynésie française, 2-6 mars 2009. (Communication Orale)

Zongo, C., Fogliani, B., Desvals, L., Henriot, L., Bouraïma-Madjebi, S**.,** 2009. Etudes approfondies de semences de Cypéracées, herbacées pionnières utilisées pour la revégétalisation des terrains miniers néo-calédoniens : le cas de *Gahnia aspera.* 11ème Inter-congrès des Sciences du Pacifique et 2emes Assises de la Recherche française dans le Pacifique, Tahiti – Polynésie française, 2-6 mars 2009. (Poster)

Fogliani, B., Zongo, C., Rabier, J., Bouraïma-Madjèbi, S., 2009. Biology, structure, and germination characteristics of two new caledonian seeds used in hydroseeding process for re-vegetation of mining sites in New Caledonia. SER International 2009 World Conference on ecological restoration, Perth, Western Australia, 23-27 juillet 2009. (Communication orale)

Fogliani B., Zongo C., Rabier J., Le Pessot L., Job C., Job D., Van Dorsselaer A., Strub J-M., Bouraïma-Madjèbi S., 2009. Premières pistes sur les stratégies d'adaptations d'espèces hyper-accumulatrices de nickel de Nouvelle-Calédonie au niveau de leur graine face à la contrainte serpentinique. 2ème colloque national du réseau français de biologie des graines, Graines 2009, Paris, 4-5 juin 2009.

REMERCIEMENTS

Voûte interne d'une case ronde traditionnelle de Lifou dévoilant la structure typique des cases séculaires alliant ici, 12 piliers et le poteau central qui permettent de supporter la structure dans son ensemble.

J'ai longtemps appréhendé cet exercice par peur d'oublier certaines personnes ou par peur que certaines d'entre elles ne se sentent pas suffisamment mises en avant, du fait de maladresse de ma part. Je me suis longuement demandé comment amener la chose et la réponse m'est venue d'un aspect symbolique fort de ma culture. La case traditionnelle (photo ci-dessus) est symboliquement forte dans sa structure. En effet, les arbalétriers (ou piliers) ainsi que le poteau central sans compter les pannes raidisseuses circulaires et les gaulettes ont tous pour rôle le maintien de la case et la bonne tenue de cette dernière. La perte d'un de ces éléments déséquilibrerait toute la structure et la rendrait moins pérenne. Ainsi, à l'image d'une case traditionnelle, plusieurs personnes ont été acteurs de l'avènement de ce projet de thèse et je tiens ici, à les remercier et leur présenter toute ma gratitude.

Avant tout, je tiens à remercier l'ensemble du jury d'avoir accepté de juger ce travail et plus particulièrement le Pr. F. Corbineau et le Pr. G. Echevarria pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'en être les rapporteurs. C'est aussi un honneur pour moi de recevoir dans mon jury, le Pr Carole Baskin, le Pr. Dominique Job, le Dr Jacques Rabier. Le rayonnement de ce jury ne peut être que profitable pour ma carrière et je vous remercie d'avance de l'honneur que vous me faites de le composer.

Tel le poteau central d'une case traditionnelle, clef de voute de cette dernière, je suis pleinement reconnaissant à mon directeur de thèse, Bruno Fogliani. Chef, Mentor, Ami et Grand frère à la fois, je n'oublierais jamais ces quatre dernières années de travail partagées ensemble et les acquis reçus. Je n'oublierais pas non plus les grandes discussions partagées concernant le pays et son devenir. Bruno ; merci pour la confiance que tu m'as accordé dans la réalisation de ce projet de thèse ; merci pour la qualité (suivi, conseils, participation à de nombreux colloques…) de cette direction de thèse, je n'aurais changé de directeur de thèse pour rien au monde, merci également pour la rigueur, la bonne gérance du travail à acquitter, les valeurs de sacrifice, de dévouement et le travail minutieux que tu auras pu montrer lors de ces 4 dernières années, j'espère avoir acquis au moins 1/10ème de ces qualités, je sais que ces

recherches te tiennent à cœur puisque tu en es l'initiateur et ce projet de thèse représente également ton premier en tant que directeur de thèse mais je souhaite te remercier vivement pour ton implication importante et sans ménagement à ces recherches. Que cette thèse soit le début d'une longue lignée. Enfin, je ne te remercierais jamais assez pour les longs palabres et les discussions échangées sur le pays et son devenir, ces discussions m'auront beaucoup appris et notamment concernant les calédoniens de souche bien que l'on se côtoie quotidiennement. Là où nos politiques rencontrent des difficultés (ouvrir des espaces de partage, de discussion), nous, on le réalise. Et malgré que nos visions respectives du devenir du pays *in fine* diffèrent quelque peu, une et même chose nous animent, la construction du pays *via* un développement soutenable. Je tenais également à remercier chaleureusement la petite famille Fogliani de Yahoué, Maman Fogliani, Papa Fogliani, et tout particulièrement Héléna, Océane et Florian pour le soutien et les retards de Papa à la Maison. Pour tout ça, Bruno, toute ma gratitude.

Je remercie chaleureusement et amicalement le Pr. Dominique Job et Claudette job, pilier incontournable de ce projet de thèse. Merci de m'avoir initié à la Protéomique et d'avoir apporté un essor sans pareil à ce projet. Ce fut un honneur d'avoir pu intégrer votre laboratoire et les échanges partagés ont été aussi intéressants que fructueux. Toute ma reconnaissance également pour les journées de vacances sacrifiées à travailler en ma compagnie, et notamment durant la phase d'interprétation des résultats et de rédaction. L'aboutissement de ce projet n'aurait pas été possible sans votre aide, encore un grand merci. Je tenais aussi à vous remercier pour le soutien aussi bien financier que moral lors de mon hospitalisation durant mon séjour sur Lyon. Vous avez été comme des parents pour moi et j'espère que nous resterons toujours en contact. Merci également Dominique pour ta vision exemplaire et juste de la recherche scientifique et notamment dans le soutien et la promotion des jeunes chercheurs et des jeunes laboratoires. Je tenais également à remercier par la même occasion, toute l'équipe du laboratoire de Bayer pour leur accueil et leur jovialité et en particulier Laurence et Chem. Laurence et Claudette, je ne vous remercierais jamais assez quant à votre aide sans pareil dans la réalisation des gels et le prélèvement des spots, travail ardu mais nécessaire.

Je souhaite adresser de sincères remerciements à Jean-Marc Strub et Alain Van Dorsselaer (CNRS, Strasbourg) pour la très haute qualité de leur analyse des protéines en spectrométrie de masse ainsi que leur professionnalisme. J'espère que les résultats présentés dans ce projet de thèse seront à la hauteur de leur renommée.

Toute ma gratitude va également à Michel Lebrun, compagnon des plus appréciés des soirées Kava-philo des vendredis, merci de m'avoir mis en contact avec Dominique sans qui, ce projet de thèse ne serait pas ce qu'il est et j'espère que l'on continuera à se voir ici, au pays.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Jacques Rabier et toute son équipe pour leur accueil, leurs conseils et le travail de très haute qualité mené en microscopie électronique à balayage. Je remercie amicalement Jean-Paul Ambrosi pour m'avoir accueilli chez lui durant cette période de stage, merci pour ta générosité, tes conseils et j'espère que le futur fera à nouveau croiser nos chemins sur des projets communs.

Mes sincères remerciements au Pr. Françoise Corbineau et au Pr. Christophe Bailly ainsi que toute l'équipe dont notamment Hayat, Emmanuel, Juliette et Jérémie. Merci pour l'accueil, les conseils avisés et le périple commun effectué jusqu'en Pologne pour la « 9th

ISSS Conference on Seed Biology ». Je n'oublierai jamais ces moments qui m'ont permis de mieux appréhender l'état de la recherche sur les graines au plan international.

I would like to thanks Craig McGill and all the members of his labs for my welcome. Thanks for your advices and for the high quality study on the transmission electron microscope. Thanks for all.

Un grand merci à tous les partenaires locaux, qui de près ou de loin ont œuvré à la réalisation de ce projet. Je remercierais ici, Laurent L'Huillier et Adrien Wulff de l'I.A.C, merci pour tous les encouragements, les échanges et les discussions partagées concernant les semences du pays qui ont vu leur concrétisation de par un chapitre réalisé conjointement dans le cadre de votre ouvrage intitulé « Mine et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration ».

Je remercie vivement la SIRAS-Pacifique et notamment Danielle Saintpierre pour les nombreuses corrections de l'anglais, les discussions échangées ainsi que la mise à disposition de lot de semences.

Je remercie également les collègues de l'IRD et notamment ceux du service Botanique pour leur aide dans l'identification de certaines plantes, pour m'avoir facilité l'acquisition de données phénologiques issues des herbiers et tout simplement pour leurs sourires et les rires partagés. J'en oublierai sûrement et je m'en excuse par avance mais je citerai Tanguy Jaffré que je remercie chaleureusement pour les longues discussions et la mise à disposition de sa bibliographie, Jérôme Munzinger, Frédéric Rigault, Gilles Dagostini, William, Jacqueline, Laurette à qui je souhaite bonne chance pour la suite et que je remercie vivement pour les renseignements et les graines récoltées concernant le genre *Psychotria*, Kiki que je remercie grandement pour son expertise botanique, que ce soit dans le cadre de mon projet de thèse, ou ailleurs, David, Romain et Isabelle pour leur bonne humeur et leurs rires.

Je tiens à remercier aussi l'équipe du CNRS de l'époque de mon vatariat (Vincent Dumontet et Pelenato Maituku) ainsi que Cyril Poullain (Actuel directeur du CNRS de Nouméa) pour m'avoir initié à la botanique en Nouvelle-Calédonie ainsi que pour les nombreux conseils avisés.

Je tiens à présent à remercier chaleureusement l'ensemble du laboratoire du L.I.V.E., et plus particulièrement Hamid Amir, directeur du laboratoire pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire et pour ses conseils précieux et notamment concernant les analyses statistiques. Je remercie aussi respectueusement René Pineau pour les conseils, son soutien et notamment dans le soutien de mon dossier en vue de mon inscription en Maitrise Science et Technique à l'Université de la Réunion. Je remercie également grandement Saliou Bouraïma-Madjèbi pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse durant mes premières années, merci pour tes conseils avisés et pour la totalité de ton œuvre au sein de l'Université de la Nouvelle-Calédonie dont je suis un pur produit. Merci aussi à Eliane Hely-Joly, Kelly Dinh, Nicolas Klein, Stéphane Mengant pour l'aide technique et leur bonne humeur qui contribuent à rendre la vie en laboratoire plus agréable.

Je décernerai plusieurs mentions particulières, tout d'abord à Véronique Gaudichon, plusieurs thésards ayant soutenu ont à chaque fois mentionné le bon café que tu prépares, je ne dérogerais pas à la règle, merci donc pour ce bon café, ta bonne humeur, ta gentillesse et ton humour. Un grand merci également pour l'appui technique lors des enseignements de Travaux pratiques.

Une mention particulière à Clément Richert, un grand merci pour ton aide technique, ton humour et ton intérêt des plus vigilants envers la biodiversité et le patrimoine naturel du pays.

Une mention spéciale à Josine Tiavouane, je ne saurais jamais assez te remercier pour ton implication dans la réalisation de ce projet de thèse et je ne comptabilise plus les heures supplémentaires à suivre des germinations ou à traiter des graines sans rechigner et toujours dans la bonne humeur. Que dire si ce n'est tout simplement merci du fond du cœur.

Une mention spéciale à Valérie Médevielle, que ferait un aveugle sans bâton ? Donc un grand merci à toi du fond du cœur, pour ton aide-technique sans laquelle rien n'aurait été possible, pour la bonne humeur, la gentillesse, la vigilance des règles de sécurité, le courage dans le travail. Pour tout cela, merci.

Je n'oublie pas les stagiaires nombreux qui ont jalonné ces quatre dernières années et principalement ceux dont j'ai pu suivre le travail tel Julie Guyot, Julie Wanegui, Carole Blay, Sébastien Bonte. A tous, j'adresse mes vifs remerciements et j'espère que la finalité de ce projet de thèse vous plaira.

Que serait un travail de recherche sans l'apport considérable des personnels administratifs ? Je tiens donc à remercier les personnels de l'Université de la Nouvelle-Calédonie et tout particulièrement les petites fées de l'accueil, Karina, Marie-No et Jeannine, je remercie également le service compta et notamment Mme Mendiboure, Alice, Fréderic, Henry, Bernard, Ruisclana, Lysiane et Francine au service du Personnel, Célestine, Nadine et François à la BU, Christine et Marie-Pierre à la scolarité, Graziella à la formation continue, et enfin, Liliane, Mumüe, Claude et Raymond pour leur sourire quotidien et les blagues douteuses.

Une mention particulière à mes compatriotes thésards, tout particulièrement la Joe's family, Nico, Rouquin, Kiki, merci pour les longues discussions partagées ensemble à refaire le monde, que ce soit sur le campus ou lors des Kava-philo du Vendredi, merci à tous. Je sais que l'on ne se perdra jamais de vue et c'est ce qui importe. Dans ce cadre, je remercie également la Laurette, Céline, Steeve, Adrien et Michel, à tous Merci pour ces bons moments. Une mention spéciale à Matthieu Villegente et Gaëlle, merci pour votre aide et vos encouragements, les SMS tardifs de la semaine ou du week-end et notamment durant la phase de rédaction. Je ne compte plus les mojitos que je vous dois. Dans tous les cas, je te souhaite bon courage pour la suite mais je ne me fais aucun souci pour la suite à donner à ce projet de thèse.

Un projet de thèse n'est pas concevable sans budget, nerf de la guerre. Je tiens donc à remercier sincèrement mes bailleurs de fonds, tout d'abord la Province Sud pour l'allocation du prix d'encouragement à la recherche et notamment, Mme Ayawa, mon interlocutrice directe que je remercie chaleureusement et amicalement pour l'écoute et la compréhension qu'elle m'aura accordé à chaque passage. De vifs remerciements également à l'entreprise Koniambo nickel SAS dont je suis salarié. Je remercie ici Isabelle Jeansoule pour la gestion de mon dossier et notamment lors de mon hospitalisation sur Lyon. Un grand merci également à toute l'équipe du service de la revégétalisation et notamment Laurent Desvals, ancien directeur du service, Antoine Leveau, actuel directeur, pour la confiance accordé et l'accueil au sein du service. Je remercie amicalement Liz Henriot pour toutes les démarches administratives, les échanges fructueux, pour l'accueil, les récoltes de semences et les encouragements, j'espère que nos collaborations ne s'arrêteront pas là.

Tout au long de mon parcours universitaire, quelques personnes ressources n'ont eu cesse de m'encourager, de me pousser de l'avant, d'aplanir des barrières me faisant face, je tiens maintenant à les remercier chaleureusement et respectueusement. Edouard Hnawia, Siwa Pamani et Thierry Xozame, je ne saurais jamais assez vous remercier tellement votre apport dans ce que j'ai pu entreprendre depuis ce jeune bachelier a été immense. Pour les modèles que vous avez été pour moi tout au long de mon cursus, oléti atraqatr.

Je souhaite à présent remercier amoureusement ma compagne, Sinecö, elle n'a cessé de m'accompagner durant cette aventure jusqu'à franchir les portes du laboratoire durant des heures interminables, à trier des graines ou à m'aider à la récolte et plus encore, à franchir seule les frontières du pays jusqu'à me rejoindre à Lyon. Ce travail n'aurait pas été possible sans ton soutien. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir supporté ma mauvaise humeur tout au long de ces années. Pour tout ça, reçois toute ma reconnaissance et si ce projet arrive à terme, c'est en grande partie grâce à toi. On a à présent énormément de chose à réaliser et à vivre ensemble mais dans tous les cas, c'est promis, plus jamais ça.

Je tiens enfin à remercier affectueusement tous les membres de ma famille qui ont de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce projet et m'ont apporté « équilibre et liberté » quatre années durant. Je ne les citerais pas tellement la famille kanak est grande. Toutefois, je remercie vivement l'équipe de la maison à Rivière Salée, merci à chacun d'entre eux pour leur disponibilité, leur soutien que ce soit financier ou moral. Merci à Aka, Canyö, Gazan, Kodrue, la famille Hnacema et notamment les parents, Hnacen et Nenema. Merci à tous pour le soutien. Je n'oublie pas la petite famille Vhemavhe à Hienghène, merci pour tout et notamment pour la petite rouge gracieusement concédée. Elle m'aura été d'une aide phénoménale.

Enfin, je tiens à remercier respectueusement mes parents sans qui rien n'aurait été possible, merci pour les sacrifices concédés, le soutien moral, les encouragements. Les valeurs de respects, d'humilité, de partage et de courage qu'ils m'ont inculquées, n'ont eu de cesse à chaque instant de me porter vers l'avant. Pour toute votre œuvre, je vous suis éternellement reconnaissant.

Abréviations

BSE : Back Scattered Electron
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
CNUCED : Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement
Cryo : Cryogénique (Cryogenics)
CTFT : Centre Technique Forestier Tropical
DTPA : Acide DiéthylèneTriaminePentaAcétique
EDX : Energy Dispersive X-ray spectrometry (Spectrométrie X Dispersive en Energie)
ETM : Eléments Trace Métallique
GPS : Global positioning system
HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)
IAC : Institut Agronomique Néo-Calédonien
IMEP : Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie
IRD : Institut de Recherche pour le Développement
ISEE : Institut de la Statistiques et des Etudes Economiques
KNS : Koniambo Nickel SAS
LEA : Late Embryogenesis Abundant
MEB : Microscop(i)e Electronique à Balayage
MET : Microscop(i)e Electronique à Transmission
MS : Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse)
MS : Matière Sèche
ONG : Organisation Non Gouvernementale
ORSTOM : Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en coopération.
PIB : Produit Intérieur Brut
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis
SE : Secondary Electron
SEM : Scanning Electron Microscopy
SER : Society of Ecological Restoration
SIRAS: Société Internationale de Réhabilitation et d'Aménagement des sites.
SLN : Société le Nickel
SMSP : Société Minière du Sud Pacifique
UNC : Université de la Nouvelle-Calédonie
XAS : X-ray Absorption Spectroscopy (Spectroscopie d'absorption des rayons X)

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE……1

ETAT DE L'ART……..……...4

I/ PRESENTATION GENERALE DE LA NOUVELLE-CALEDONIE 4
I.1/ Position dans le monde 4
I.2/ Situation politique et sociale 5
I.3/ Situation économique 7
II/ Environnement naturel de la Nouvelle-Calédonie 11
II.1/ Le climat (Service météorologique de la Nouvelle-Calédonie, 2010) 11
II.2/ Le relief 13
II.3/ Les roches 13
II.4/ La flore 14
III/ Le milieu ultramafique 18
III.1/ Les roches ultramafiques : Définition 18
III.2/ Les roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie 19
III.3/ Les caractéristiques édaphiques du milieu ultramafique 23
III.4/ Les formations végétales en milieu ultramafique 25
III.5/ L'exploitation du nickel 27
IV/ La restauration écologique 29
IV.1/ Historique de la revégétalisation 29
IV.2/ Succession végétale dans les maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie 30
IV.3/ La restauration écologique en Nouvelle-Calédonie 30
V/ La multiplication sexuée 32
V.1/ Structures des fruits et des graines 33
V.2/ Types de graines 34
V.3/ La germination des graines 35
VI/ Le nickel dans les plantes 39
VI.1/ Généralités (biodisponibilités, absorption, transport et phytotoxicité du nickel) 39
VI.2/ Distribution et localisation dans la plante entière 41
VI.3/ Spéciation du nickel 41
VI.4/ Les stratégies de réponse au stress nickélifère 42
VI.5/ Nickel et semence 45

CHAPITRE 1 : BIOLOGIE DES SEMENCES D'ESPECES PIONNIERES CANDIDATES A LA REVEGETALISATION : REPONSE AUX FACTEURS CLIMATIQUES……..47

I/ Introduction..... 47

II/ Résultats détaillés obtenus sur les semences de 3 espèces candidates à la revégétalisation des terrains miniers dégradés. 49

II.1/ Résultats de l'étude détaillée concernant les semences d'une espèce de Cyperaceae pionnière : Gahnia aspera (R. Br.) Spengel..... 50

II.2/ Résultats de l'étude détaillée concernant les semences d'une espèce de Rhamnaceae pionnière : Alphitonia neocaledonica (Schltr.) Guillaumin 63

II.3/ Résultats de l'étude détaillée concernant les semences d'une espèce de Proteaceae pionnière : Grevillea exul ssp. exul (Lindley)..... 78

III/ Résultats transversaux et discussion 101

IV/ Conclusion 119

CHAPITRE 2 : BIOLOGIE DES SEMENCES D'ESPECES HYPERACCUMULATRICES DE NICKEL : REPONSE AUX FACTEURS EDAPHIQUES.....162

I/ Introduction..... 121

II/ Suivi phénologique de *Psychotria douarrei* et de *Psychotria baillonii* 124

III/ Etude écophysiologique des graines de *P. douarrei* et de *P. baillonii* 127

III.1/ Structure du fruit et de la graine..... 127

III.2 Viabilité et germination..... 130

III.3/ Taux d'humidité et composition biochimique des réserves séminales 133

IV/ Caractéristiques ultrastructurales et minérales du fruit et de la graine de *Psychotria douarrei* et de *P. baillonii.* 135

IV.1/ Composition et distribution des éléments minéraux dans les semences de deux espèces de Psychotria néo-calédoniennes dont l'hyperaccumulatrice P. douarrei..... 135

IV.2/ Caractéristiques minérales des fruits de Psychotria douarrei et Geissois pruinosa ou la découverte de cristaux de sels de nickel..... 148

V/ Etude protéomique des graines de *P. douarrei* 155

V.1/ Introduction 155

V.2/ Test de germination en présence de différentes concentrations de nickel 157

V.3/ Etude du protéome des graines matures sèches de P. douarrei 159

V.4/ Etude protéomique comparative des différents tissus des graines matures sèches de P. douarrei..... 175

V.5/ Etude protéomique de la graine germée de P. douarrei en présence de différentes concentrations de nickel. 178

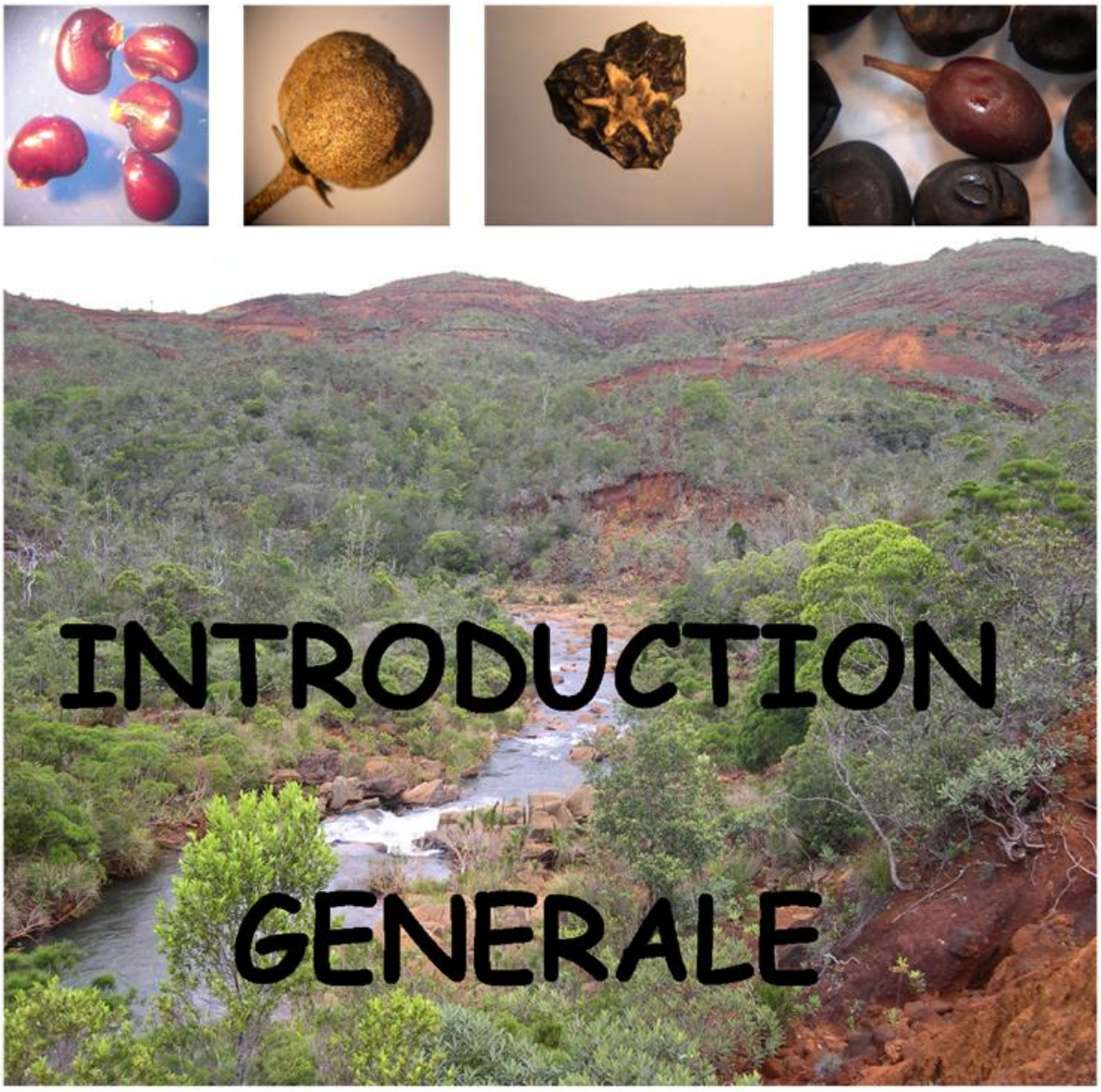
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES…….184

PARTIE EXPERIMENTALE……..188

I/ Matériel végétal 188
II/ Phénologie et distribution géographique 188
III/ Description de l'individu adulte 188
IV/ Techniques et conseils de récolte/extraction et conditionnement des graines 189
V/ Taux d'humidité des semences 189
VI/ Stockage des semences 189
VII/ Détermination du nombre de graine par unité de poids 190
VIII/ Description du fruit et de la semence 190
VIII.1/ Structure externe 190
VIII.2/ Structure interne 190
VIII.3/ Ultrastructure 190
IX/ Composition biochimique des réserves séminales 193
IX.1/ Teneur en protéine totale 193
IX.2/ Teneur en lipide neutre 194
IX.3/ Teneur en glucides hydrosoluble 194
IX.4/ Teneur en amidon 195
IX.5/ Teneur en acide gras des lipides neutres 195
X/ Test d'imbibition 198
XI/ Taux de viabilité 198
XII/ Tests de germination 199
XII.1/ Désinfection 200
XII.2/ Différents traitements pour la levée de dormance 200
XII.3/ Température optimale de germination 203
XIII/ Tests de conservation 203
XIV/ Etude protéomique 203
XIV.1/ Extraction des protéines 203
XIV.2/ Dosage des protéines 205
XIV.3/ Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis) 206

BIBLIOGRAPHIE……213

ANNEXES.……229


INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Au cours de son évolution, une grande partie de la Nouvelle-Calédonie (environ 40% de la Grande Terre) s'est progressivement recouverte d'un feuillet de roches ultrabasiques. Ces roches, réduites par l'érosion et l'altération, ont donné naissance à des terrains miniers exceptionnellement riches en métaux lourds (tels que le Nickel, le Cobalt, le Manganèse et le Chrome), et particulièrement pauvres en matière organique et en éléments nutritifs (Calcium, Potassium, Phosphore, Azote). Cette altération a en particulier favorisé l'enrichissement des manteaux en oxydes de nickel. Cette matière première, concentrée en surface par un mécanisme naturel, est à la base du développement économique de ce pays, puisque très recherchée par de grands groupes d'exploitation minière.

Ces sols issus des roches ultramafiques, sont très peu propices à la végétation et ont favorisé l'apparition d'une flore adaptée à leur pauvreté, à leur déséquilibre minéral et à leur toxicité, éléments majeurs caractérisant le « syndrome serpentinique ». A ces facteurs édaphiques contraignants, viennent s'ajouter des facteurs climatiques extrêmes, une faible biodisponibilité de l'eau, des précipitations qui peuvent être abondantes mais sporadiques, des températures variables et saisonnières, et un faible taux de recyclage de la matière organique.

Le résultat de cette pression de sélection, est une flore extrême et unique, constituée de plus de 3300 espèces distinctes dont 75% sont endémiques et 40% environ sont confinés sur des sols. Cette biodiversité néo-calédonienne est extrêmement importante autant de par son endémicité que par son originalité et elle est encore plus importante si l'on considère les milieux ultramafiques (près de 90%).

Cette biodiversité rare convient d'être protégée et conservée. En particulier, dans le contexte actuel de développement minier et l'ouverture de deux nouvelles usines dans le Nord et le Sud de la Nouvelle-Calédonie, il est essentiel d'œuvrer vers la restauration des sites après exploitation. Notre capacité à recréer l'écosystème initial dépend étroitement de notre compréhension des mécanismes par lesquels les plantes endémiques se sont adaptées à la contrainte ultramafique. Qu'elles soient résistantes, simplement tolérantes ou hyper-accumulatrices, les plantes endémiques des sols ultramafiques de la Nouvelle-Calédonie ont

développé des mécanismes spécifiques qui leur permettent de croître sur ces sols riches en métaux lourds et notamment le nickel. Ainsi, plusieurs équipes de recherches néo-calédoniennes dont notre laboratoire du LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) ont entrepris l'étude de ces mécanismes adaptatifs. Pour cela, différents thèmes de recherche coexistent autour de la thématique centrale « Sol-Plantes-Microorganismes » dans les écosystèmes miniers de la Nouvelle-Calédonie, en utilisant différents types d'approches (physiologiques et éco-physiologiques, microbiologiques, chimiques, biochimiques et génétiques).

A l'exception de quelques mémoires d'étudiants, aucun travail n'a été réalisé, ni sur les adaptations morphologiques des semences des plantes endémiques de la Nouvelle-Calédonie, ni sur la nature de leurs réserves séminales. Ces données conditionnent pourtant en grande partie leur capacité à se conserver et à germer dans un environnement édaphique et climatique *a priori* hostile. « L'équipe semence » du laboratoire LIVE menée par le Docteur Fogliani (MCF, HDR) a pour challenge, l'étude et la compréhension des mécanismes adaptatifs ayant cours dans les semences d'espèces de milieux ultramafiques.

Ce projet de thèse qui découle de ce contexte a eu pour objectif l'étude de la structure des graines et de la composition biochimique de leurs réserves en relation avec leur adaptation au milieu.

Axes du travail et rendu

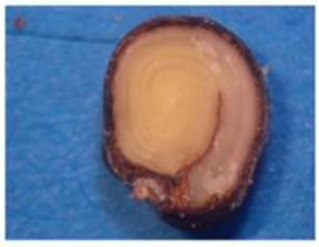
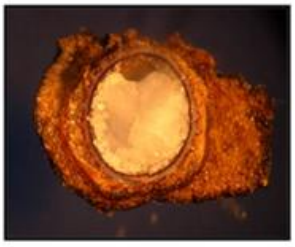
Il sera tout d'abord réalisé dans la première partie après, avoir située la Nouvelle-Calédonie et le contexte de l'étude, une revue détaillée de nos connaissances actuelles sur les écosystèmes ultramafiques. Il sera aussi défini dans cette partie les caractéristiques importantes qui attraient aux graines de manière générale afin de mieux apprécier celles des graines faisant partie de cette étude. Enfin, une revue détaillée concernant les connaissances actuelles des mécanismes de tolérance au nickel ainsi que les relations nickel-semences seront abordées.

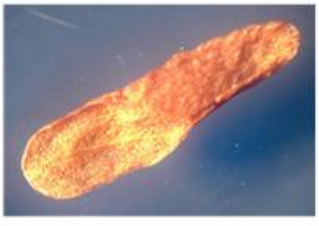
Dans une deuxième partie, nous envisagerons la caractérisation des principales données biologiques de semences de 45 espèces évoluant principalement sur maquis minier, Ces données comprennent des données sur la structure anatomique, la composition des réserves séminales, la germination et la conservation des semences. L'objectif clairement

affiché est double, la compréhension des mécanismes adaptatifs développés par les semences de ces espèces face au milieu et notamment en réponse aux conditions climatiques. Et dans un deuxième temps, la mise en place de protocoles fiables optimisant la germination et la conservation de ces semences dans le cadre de leur utilisation dans la revégétalisation.

Dans une troisième partie, nous nous attacherons à caractériser les mécanismes intervenant dans la réponse de tolérance au nickel et plus particulièrement du mécanisme d'hyperaccumulation. En effet, la Nouvelle-Calédonie est reconnue pour détenir la plus importante concentration d'espèces hyperaccumulatrices de nickel. Afin d'atteindre nos objectifs, nous nous sommes attachés à étudier un couple modèle *Psychotria douarrei* (Rubiaceae), une espèce hyperaccumulatrice de nickel et *Psychotria baillonii* (une non hyperaccumulatrice), l'une évoluant à 50 mètres de l'autre dans le milieu naturel. Plusieurs approches seront abordées, une approche écophysiologique tout d'abord, ciblant essentiellement la réponse germinative des semences de *P. douarrei* face au nickel. Une approche ultrastructurale abordant la répartition des éléments minéraux au sein de la semence et enfin, une approche protéomique innovante dans la caractérisation de la première carte protéomique d'une espèce hyperaccumulatrice de nickel, *P. douarrei.*

ETAT DE L'ART



ETAT DE L'ART

I/ PRESENTATION GENERALE DE LA NOUVELLE-CALEDONIE

I.1/ Position dans le monde

La Nouvelle-Calédonie est un pays d'outre-mer (anciennement territoire) situé entre 17° et 23° de latitude Sud, juste au dessus du tropique du Capricorne, et entre 163° et 167° de longitude Est. Elle appartient à la ceinture interne mélanésienne de l'Océanie, dans la partie occidentale et méridionale de l'océan Pacifique (Figure 1). Troisième île du Pacifique, la Nouvelle-Calédonie présente une superficie totale de 1 740 000 km² en comptant les aires maritimes avec 19100 km² de terres émergées. La plus grande île, nommée Grande Terre, étroite et étirée fait plus de 400 km de long et 50 km de large. Les autres principales îles sont l'Ile des Pins au sud de la Grande Terre, ainsi que les Iles Loyauté (Maré, Lifou, Tiga et Ouvéa) à l'est. La Nouvelle-Calédonie compte aussi un grand nombre d'îlots actuellement inhabités : Chesterfield, Walpole, Surprise, Huon, Matthew, Fearn, Hunter, Beautemps-Beaupré etc.

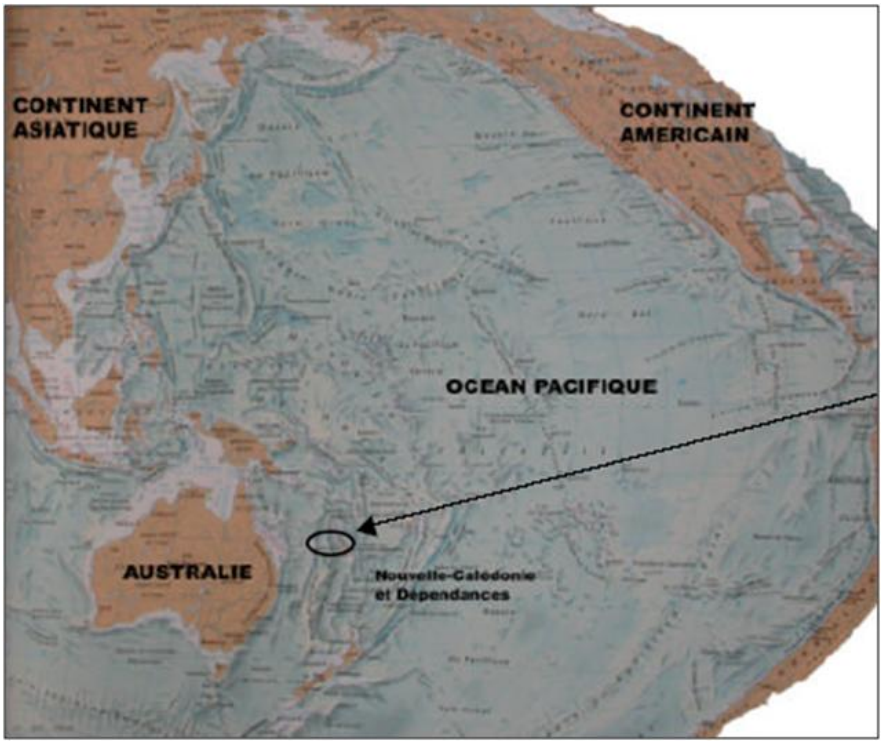


Figure 1 : Positionnement géographique de la Nouvelle-Calédonie dans le Pacifique Sud

La Grande Terre est une île au relief inégal mais bien marqué, 80% de sa superficie étant dessinée par un modelé montagnard, les trois quarts ne dépassant pas 500 m. Soumis à un climat tropical, tempéré par l'influence océanique, le pays possède une flore autochtone riche induite par l'isolement marqué des terres néo-calédoniennes. Le continent le plus proche est l'Australie à 1500 km à l'ouest. Au nord-est, on retrouve le Vanuatu à 800 km et au sud, la Nouvelle Zélande à 1700 km.

Cet isolement géographique a engendré au cours des millénaires une originalité importante de sa flore, conférant aux terres de la Nouvelle-Calédonie un très fort endémisme (76,8%), plaçant ce dernier comme l'un des « hotspots » mondiaux en terme de biodiversité (Myers et al., 2000; Kier et al., 2009).

I.2/ Situation politique et sociale

La situation socio-politique de la Nouvelle-Calédonie est à l'image de la biodiversité naturelle. Elle est aussi originale qu'innovante. La Nouvelle-Calédonie est aujourd'hui un « POM » (Pays d'Outre-mer). Depuis les accords de Matignon et Oudinot signés en 1988, la Nouvelle-Calédonie est divisée en trois provinces administrées par des assemblées : la province Nord, la province Sud et la province des Iles loyauté. Le Congrès du territoire forme l'union des trois assemblées provinciales (Figure 2).

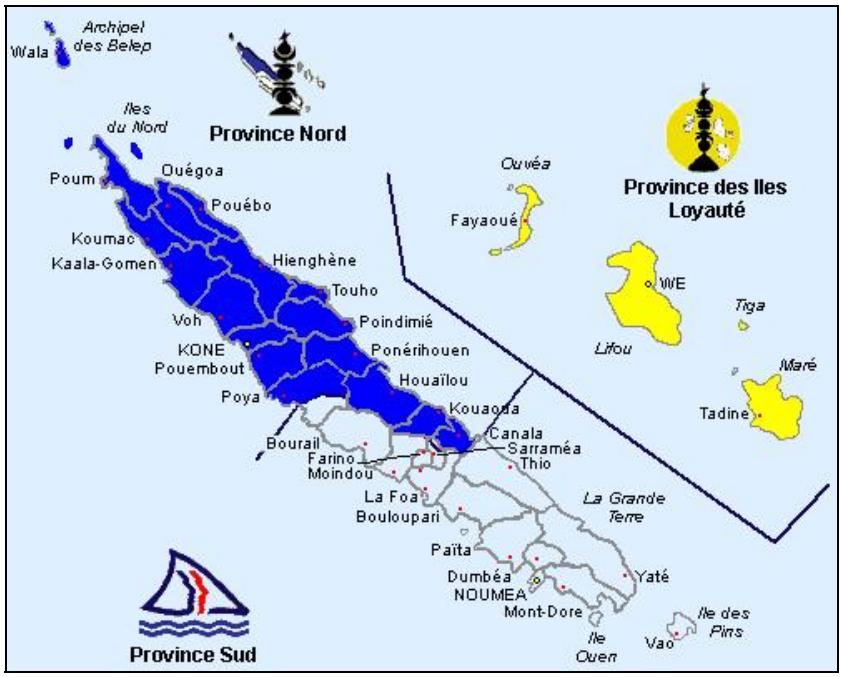


Figure 2 : Provincialisation de la Nouvelle-Calédonie

Ces accords devaient préparer la Nouvelle-Calédonie à l'autodétermination en 1998, en réduisant les inégalités régionales et ils ont abouti le 5 mai 1998 à une entente conclue entre les deux grandes tendances politiques de l'époque (le RPCR 'Rassemblement Pour la Calédonie dans la République' et le FLNKS 'Front de Libération Nationale Kanak et Socialiste') et l'état français. Cette entente s'est traduite par la signature de l'Accord de Nouméa voté par plus de 72% de la population néo-calédonienne et qui comprend deux documents, un *préambule* et un *document d'orientation*. Le *préambule* décrit les conséquences de la colonisation sur l'identité Kanak et reconnaît que «le choc de la colonisation a constitué un traumatisme durable pour la population d'origine» de la Nouvelle-Calédonie, le texte précise que «le moment est venu de reconnaître les ombres de la période coloniale, même si elle ne fut pas dépourvue de lumières». Constatant qu'il est aujourd'hui «nécessaire de poser les bases d'une citoyenneté de la Nouvelle-Calédonie», les signataires affirment la volonté, dix ans après les accords de Matignon, «d'ouvrir une nouvelle étape marquée par la pleine reconnaissance de l'identité Kanak, préalable à la révision d'un contrat social entre toutes les communautés qui vivent en Nouvelle-Calédonie, et par un partage de souveraineté avec la France, sur la voie de la pleine souveraineté».

Le document d'orientation, second volet de l'accord, définit les principes de l'organisation politique et sociale de la Nouvelle-Calédonie pour la période transitoire des quinze à vingt prochaines années. Il traite successivement de l'identité Kanak, des institutions, de la répartition et des transferts de compétences, du développement économique, social et culturel, des modalités de sortie de la période transitoire et des modalités de mise en œuvre de l'accord. Le *document d'orientation* prévoit ainsi le transfert progressif à la Nouvelle-Calédonie de certains pouvoirs mises à part les compétences « régaliennes ». Concernant le pouvoir législatif, il sera exercé par les trois assemblées de province, dont une partie des membres constitueront le Congrès de la Nouvelle-Calédonie pour les affaires d'intérêt commun. L'exécutif sera entre les mains d'un gouvernement collégial. Un Sénat coutumier sera consulté sur les sujets intéressant «l'identité Kanak».

L'Accord de Nouméa prévoit que dans 20 ans au maximum, ou 15 ans au minimum, soit entre 2014 et 2019, les néo-calédoniens seront appelés à décider par référendum s'ils souhaitent le maintien de leur pays dans la République Française ou son accession à l'indépendance complète. Depuis 1998, du fait de sa relative stabilité, l'économie de la Nouvelle-Calédonie a connu un essor considérable.

I.3/ Situation économique

I.3.1/ Vue d'ensemble

L'économie de la Nouvelle-Calédonie a bénéficié ces dernières années d'une croissance soutenue, non inflationniste et sans choc, ce qui lui a permis d'atteindre un niveau de développement bien supérieur à l'ensemble de l'outre-mer français. Dans sa zone économique, elle se place derrière l'Australie et la Nouvelle-Zélande. Le niveau de vie a ainsi convergé vers les standards métropolitains.

La caractéristique la plus marquante de l'économie néo-calédonienne est la forte hausse de la part de l'investissement dans le PIB qui est passée de 21% à 35% entre 1998 et 2006. Cette hausse du taux d'investissement est principalement tirée par le secteur privée (87% en 2006) qui place la Nouvelle-Calédonie entre l'Inde (30%) et la chine (39%) (ISEE, 2010). Le PIB/habitant est en 2009 de 20% (23 000 euros) contre 29 000 euros dans l'hexagone. La Nouvelle-Calédonie a un niveau de vie près de 50% plus élevé que celui de la moyenne des départements d'Outre mers.

Tableau 1 : PIB/habitant des régions d'outremer françaises (ISEE, 2010).

	PIB/ habitant (euros)	**Principales ressources**
Nouvelle-Calédonie (2007)	26 560	Nickel, pêche, aquaculture, tourisme
Martinique (2006)	19 050	Banane, canne à sucre, rhum, melon, ananas, tourisme
Polynésie française (2005)	17 320	Coprah, vanille, perliculture, tourisme, pêche
Réunion (2006)	16 240	Canne à sucre, rhum, essences végétales, tourisme, pêche
Guyane (2003)	12 380	Activité spatiale de la base de Kourou, bois, riz, pêche (crevettes), élevage
Guadeloupe (2006)	12 380	Canne à sucre, rhum, banane, tourisme

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'économie de la Nouvelle-Calédonie est d'abord une économie de service. Le secteur tertiaire constitue le secteur le plus productif de la Nouvelle-Calédonie. En effet, les services restent la principale source de richesse et représentent en 2006, 69% du total de la valeur ajoutée. Néanmoins, l'industrie du nickel explique un quart de la croissance entre 1998 et 2006 et elle est appelée à se développer ces prochaines années avec la mise en service de deux nouvelles usines de traitements du nickel. Dans tous les cas, il est bon de rappeler que l'industrie du nickel est tributaire des cours mondiaux.

I.3.2/ La filière nickel

Le nickel est une matière première d'une grande importance, elle est utilisée principalement (4/5ème) dans de nombreux alliages. Sur ces 80%, 65% sont destinés à la fabrication d'acier inoxydable réfractaire (Figure 3).

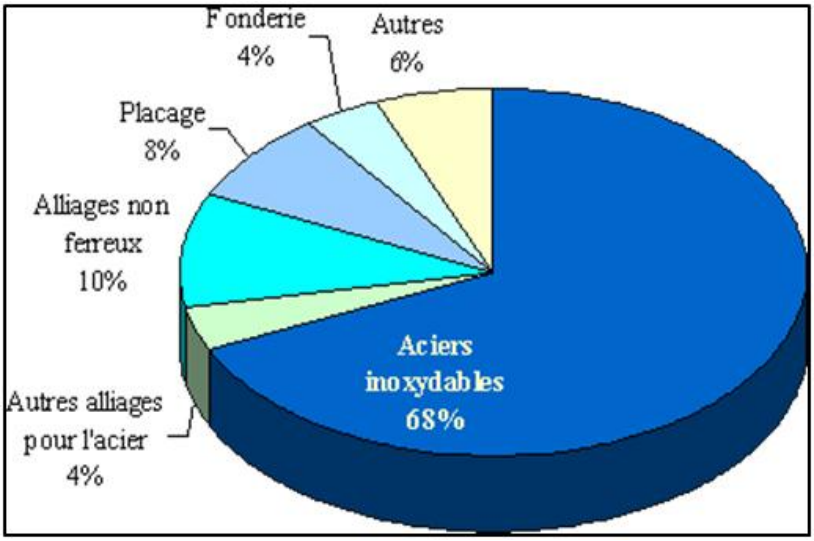


Figure 3 : Répartition des secteurs d'utilisation du nickel (Secrétariat du CNUCED, 2010)

Depuis les années 1990, la production annuelle de nickel mondiale excède le million de tonnes (Figure 4). Vingt pays, tous continents confondus l'exploitent et 25 pays le raffinent et le fondent, ce qui fait de ce marché un secteur relativement intégré (Figure 5).

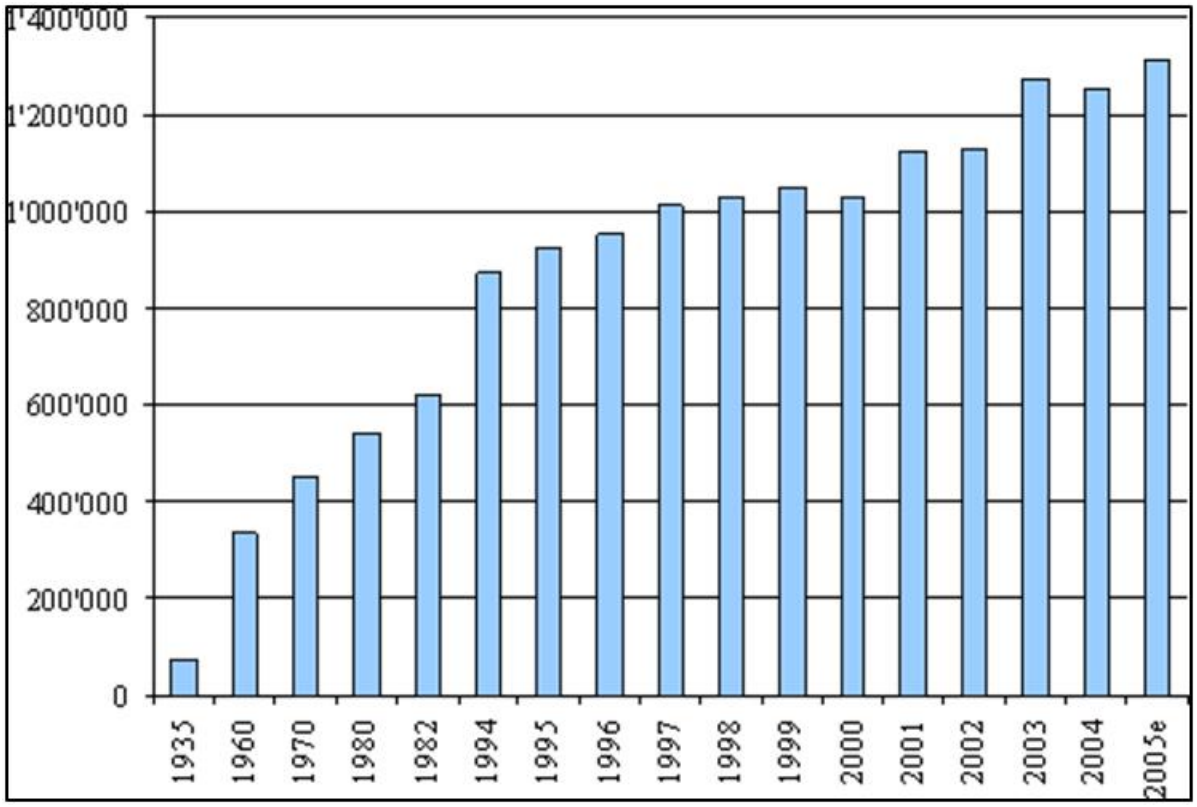


Figure 4 : Production mondiale de nickel entre 1935 et 2005[e] (e : e signifie que la valeur correspond à une estimation) (Secrétariat du CNUCED, 2010)

La Nouvelle-Calédonie détient entre 20 et 40% des réserves mondiales de nickel. Elle est le 5[ème] producteur mondial de minerai de nickel dont 95% sont destinés à l'exportation (Figure 5).

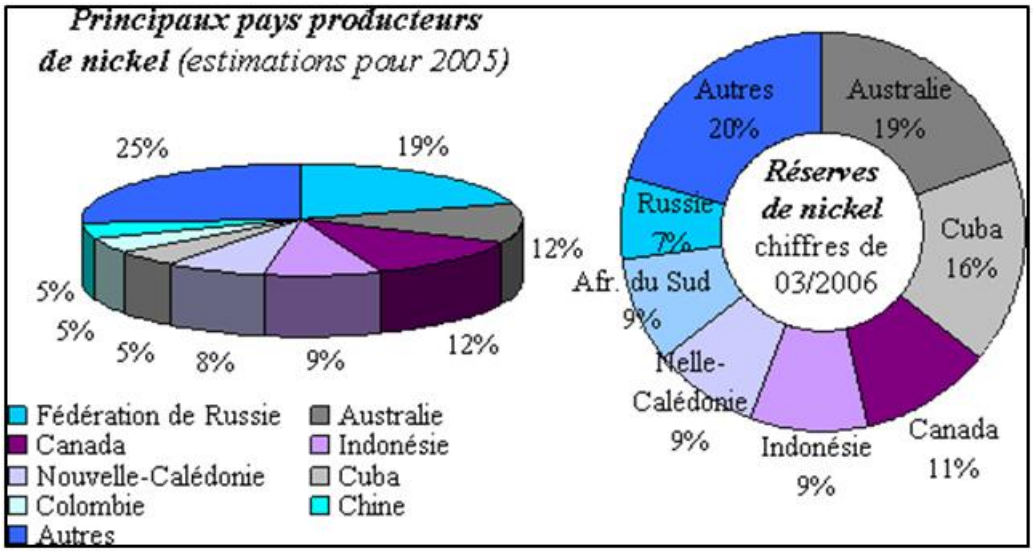


Figure 5 : Principaux pays producteurs de nickel (estimations pour 2005) (secrétariat du CNUCED, 2010)

L'industrie minière représente entre 5 et 25% du PIB du territoire, 90% des exportations commerciales, et joue un rôle primordial dans l'économie du pays. Compte tenu de la consommation actuelle (Figure 6) et de l'importance des réserves de nickel calédonien estimées entre 20 et 40% des gisements mondiaux, l'industrie minière représente une activité en pleine expansion, dont la production pourrait atteindre dans un avenir proche les 200 000 tonnes de nickel métal (contre une moyenne de 115 000 tonnes ces 5 dernières années).

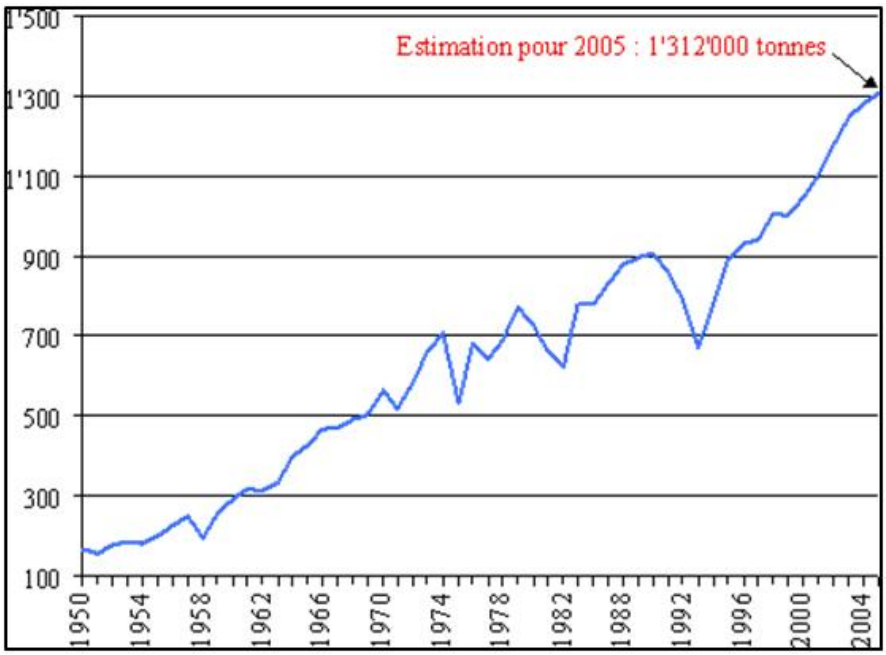


Figure 6 : Evolution de la demande mondiale en nickel (secrétariat du CNUCED, 2010)

L'extraction de l'«Or vert» (Figure 7) représente donc un véritable potentiel de développement économique pour le territoire.

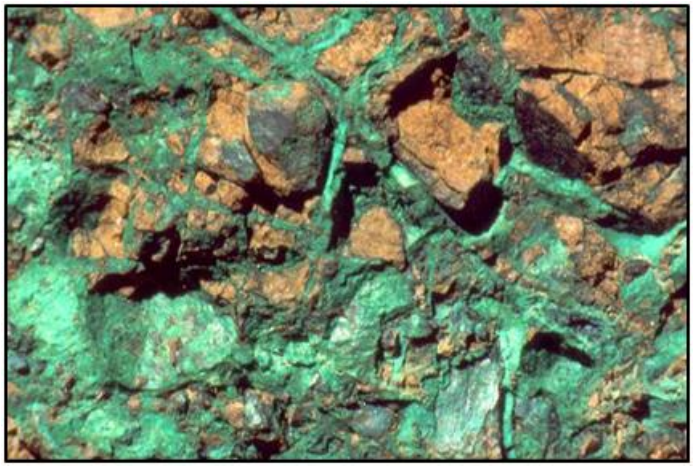


Figure 7 : Brèches à saprolites (ocre) et à élément de ciment de garniérites (vert) (Pelletier, 2003)

Actuellement, 4 groupes multinationaux extraient et conditionnent le minerai de nickel néo-calédonien. La société Eramet-SLN qui est implantée depuis de nombreuses années sur le territoire. D'importants projets miniers sont également en cours de développement (exemple de la mise en place du projet Goro Nickel par Vale-Inco, et de « l'Usine du Nord » initiés par la SMSP et Xstrata).

II/ Environnement naturel de la Nouvelle-Calédonie

II.1/ Le climat (Service météorologique de la Nouvelle-Calédonie, 2010)

La Nouvelle-Calédonie est située dans la zone intertropicale. Très isolée géographiquement et soumise au courant des alizés, elle bénéficie d'un climat relativement tempéré, que l'on peut qualifier de "tropical océanique".

La variation annuelle de la position de la ceinture anticyclonique subtropicale et des basses pressions intertropicales détermine deux saisons principales séparées par deux intersaisons :

- de mi-novembre à mi-avril : c'est la saison chaude et humide, dite "saison des cyclones". Des dépressions se forment et évoluent parfois en cyclones tropicaux qui affectent fréquemment le territoire et conduisent à de fortes pluies.
- de mi-avril à mi-mai : c'est une saison de transition. Les perturbations tropicales sont rares, la pluviosité diminue et la température décroît sensiblement.
- de mi-mai à mi-septembre : c'est la saison fraîche. La température de l'air passe par son minimum annuel.
- de mi-septembre à mi-novembre : c'est la saison sèche. La température de l'air augmente progressivement, tandis que la pluviosité est à son minimum annuel. L'alizé souffle en quasi permanence. C'est la période la plus belle de l'année, mais aussi la plus sèche.

Cependant, les irrégularités de climat peuvent être nombreuses, ainsi, la pluviométrie est dépendante des pluies cycloniques et des dépressions tropicales qui varient d'une année sur l'autre, ainsi que des régimes ENSO (El Niño Southern Oscillation).

Néanmoins, on peut observer quelques constantes, ainsi, généralement, la côte Est de l'île perçoit deux fois plus de pluie que la côte Ouest du fait de la chaîne montagneuse centrale étendue sur toute la longueur de l'île et de l'exposition aux vents dominants (Figure 8).

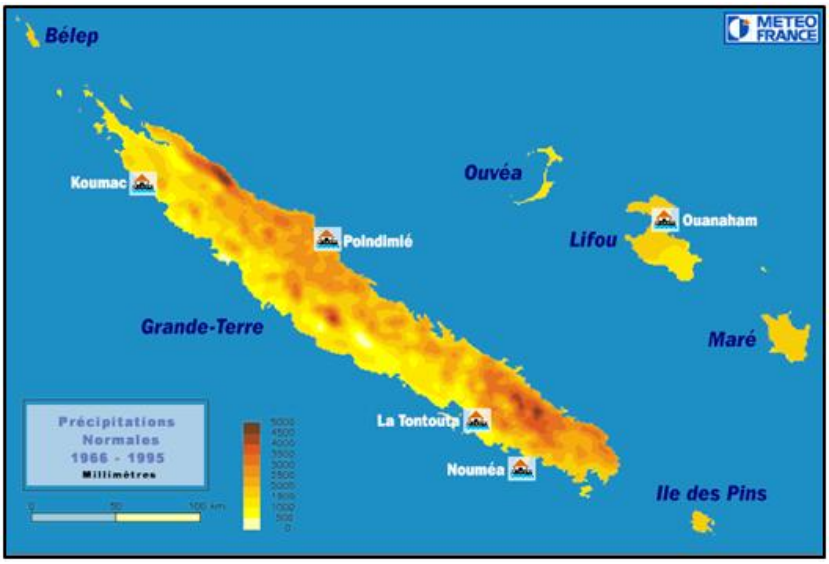


Figure 8 : Précipitations annuelles moyennes de 1966 à 1995 en Nouvelle-Calédonie.

Les massifs montagneux ainsi que l'extrême sud de l'île exposés aux alizés peuvent percevoir plus de 3000 mm de pluie par an.

La température annuelle moyenne est comprise entre 22 et 24°C. La différence entre le Nord et le Sud est faible puisque l'écart est de 2°C. Les zones d'altitudes comme le col d'Amieu voient leurs températures ne diminuer que de 0,5° par tranche de 100 mètres en saison fraîche et de 0,8° en saison chaude ; malgré tout, les températures en saison fraîche peuvent descendent sous la barre des 10°C (Figure 9).

L'ensoleillement est maximum durant les mois d'octobre à décembre.

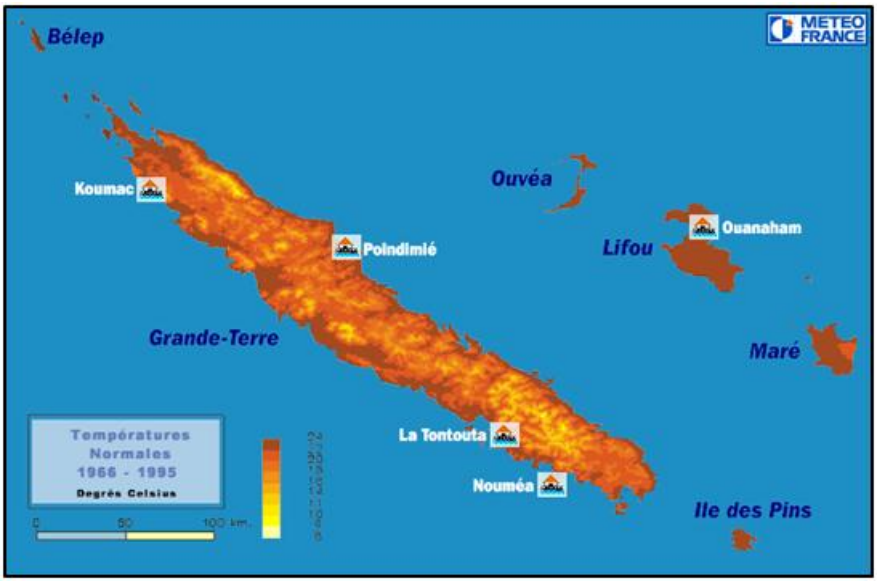


Figure 9 : Températures annuelles moyennes de 1966 à 1995 en Nouvelle-Calédonie

II.2/ Le relief

La Grande Terre est une île au relief inégal mais bien marqué, tandis que celui des Iles Loyauté est caractérisé par une remarquable platitude. 80% de la superficie de la Grande Terre sont escarpés mais l'altitude dans ces zones ne dépasse pas 500 m. Une chaîne montagneuse dénommée « la chaîne centrale » est positionnée sur toute la longueur de la Grande Terre excepté dans la partie extrême sud (Plaine des lacs). Le point culminant de l'île est le Mont Panié, situé en bordure du littoral sur la côte Est avec 1628 m. Il existe très peu de plateaux et les lacs sont rares.

II.3/ Les roches

Les roches de Nouvelle-Calédonie sont d'origines diverses et les roches sédimentaires anciennes sont des schistes, des micaschistes, des flyschs et des phtanites (Figure 10). Les roches plus récentes sont des péridotites, des granites, des basaltes et des gabbros (Cornuet et al., 1987). Les Iles Loyauté sont essentiellement formées de calcaire récifal.

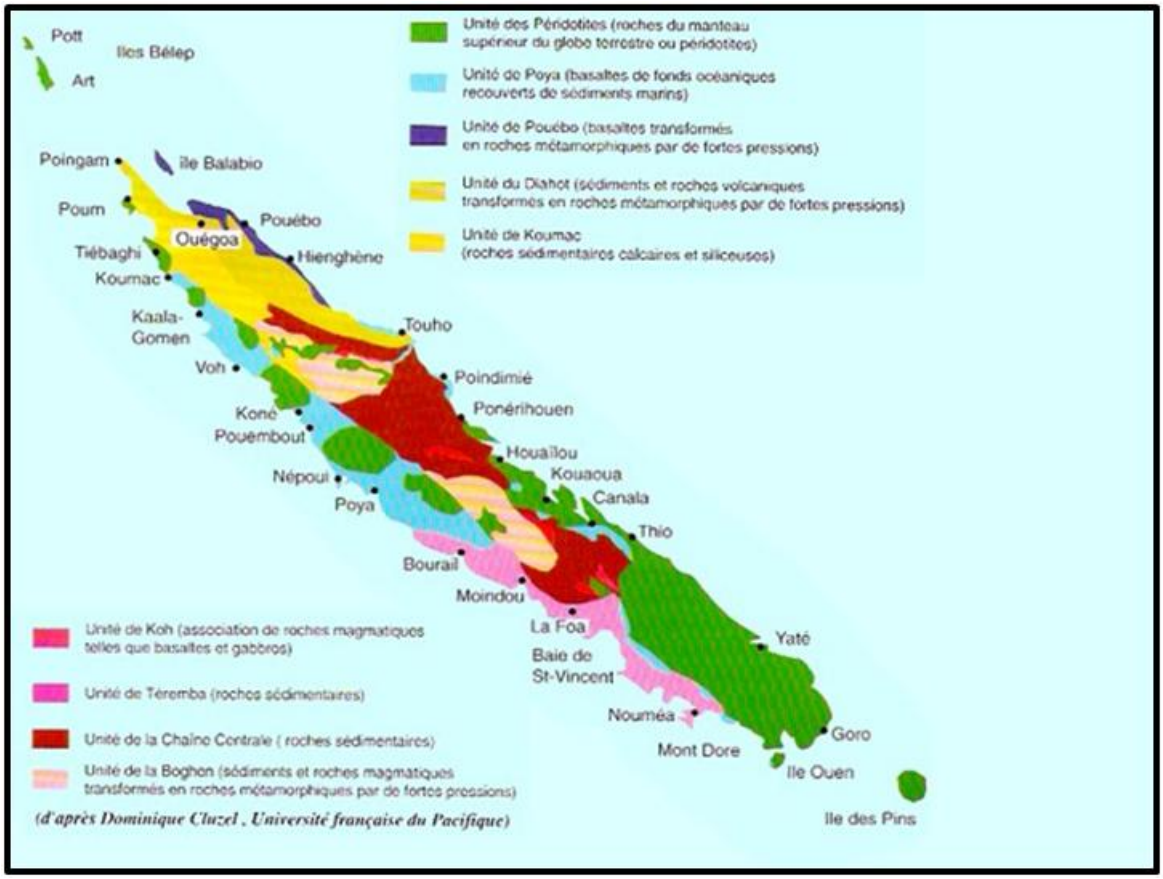


Figure 10 : Carte géologique des roches de la Nouvelle-Calédonie

II.4/ La flore

Le caractère insulaire de la Nouvelle-Calédonie, la multitude de substrat et les conditions climatiques variées ont permis l'émergence d'une riche biodiversité. La flore néo-calédonienne est particulièrement renommée pour sa diversité, avec plus de 3200 espèces de plantes vasculaires indigènes, pour son originalité, étant donné que 76,8% de ces espèces sont endémiques au territoire (Jaffré et al., 2004) et les menaces qui pèsent sur celle-ci (Jaffré *et al.*, 1998; Morat *et al.*, 1999). La Nouvelle-Calédonie est l'un des dix « hotspots » mondiaux en termes de biodiversité. La Nouvelle-Calédonie est l'une des rares zones au monde à être à la fois prioritaire pour la conservation de biodiversité terrestre (Myers, 1988; Myers et al., 2000; Mittermeier et al., 2004) et marine (Roberts *et al.*, 2002).

La richesse de la flore néo-calédonienne n'est pas seulement le fait du taux important d'endémicité mais elle est également la résultante de la composition particulière de cette dernière. En effet, la Nouvelle-Calédonie est le territoire qui possède la plus grande diversité de conifères de toute la zone pacifique (de Laubenfels, 1996) avec en particulier les Araucarias de la famille des Araucariaceae et le *Parasitaxus ustus* (Podocarpaceae), seul gymnosperme parasite au monde et endémique de la Nouvelle-Calédonie.

La Nouvelle-Calédonie possède également une forte concentration d'angiospermes basales avec la plus connue des botanistes *Amborella trichopoda*, considérée comme la seule représentante de la famille des Amborellaceae et de l'ordre des Amborellales et qui constituerait à elle seule, le groupe frère de toutes les autres plantes à fleurs actuelles (Soltis et al., 1997; Qiu et al., 1999; Soltis et al., 1999).

La Nouvelle-Calédonie possède également avec Cuba la plus grande concentration au monde d'espèces hyperaccumulatrices de métaux lourds, et de nickel plus particulièrement (Brooks, 1998). Ces plantes peuvent contenir dans leurs tissus des doses élevées de métaux qui sont létales pour le commun des plantes. L'exemple le plus marquant est celui de *Sebertia accuminata* (Sapotaceae), dont le latex est bleu-vert en raison de sa forte concentration en nickel, qui représente jusqu'à 25% de son poids sec (Jaffré *et al.*, 1976).

Cette richesse floristique est cependant répartie inégalement à travers le territoire calédonien. Presque toutes les espèces connues ont été retrouvées sur la Grande Terre dont les secteurs les plus riches sont la partie méridionale, les massifs miniers de l'Ouest et les massifs de roches micaschisteuses situés entre Hienghène et Ouégoa. La flore des terrains miniers et la flore de montagne ont un très fort taux d'endémisme (Schmid, 2000).

Quatre grandes familles sont majoritaires (Jaffré et Pelletier, 1992) :

- Myrtaceae
- Rubiaceae
- Orchidaceae
- Euphorbiaceae

Les principales formations végétales sont les suivantes (Figure 11) :

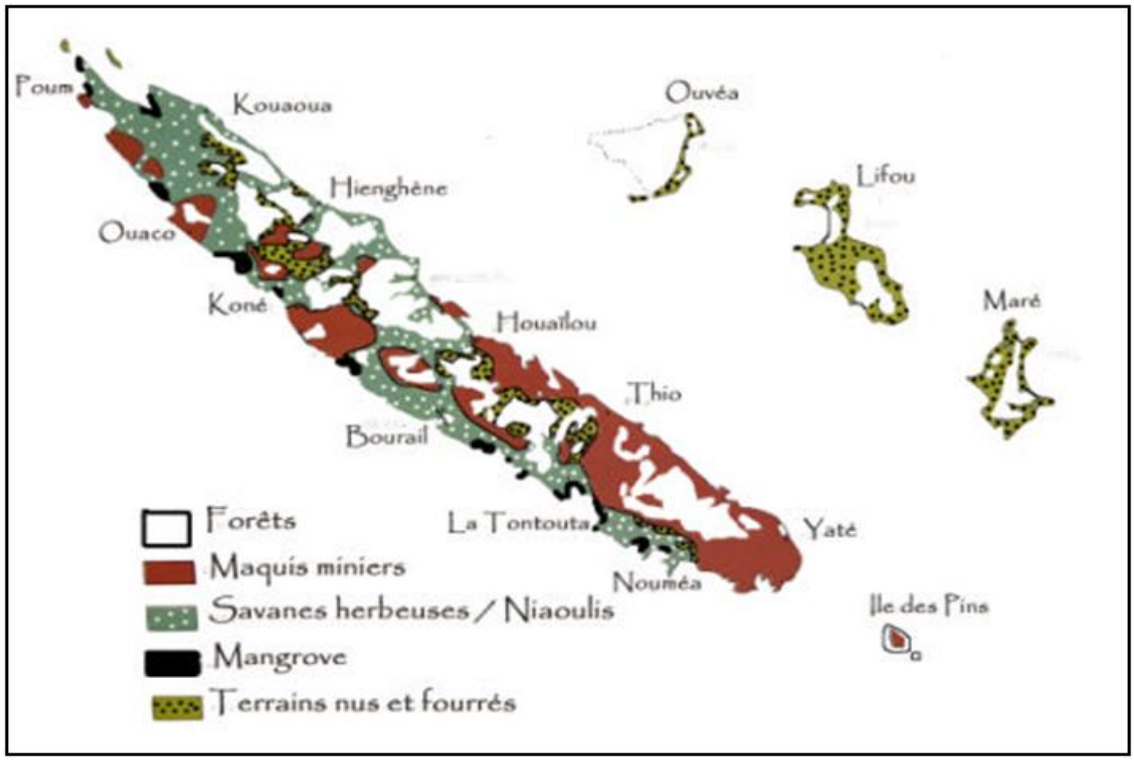


Figure 11 : Principales formations végétales de la Nouvelle-Calédonie (Cornuet et al., 1987).

- **Les forêts**

Elles comprennent la forêt humide sempervirente et la forêt sèche.

- La forêt sèche est une forêt sclérophylle aujourd'hui faiblement représentée (50 km²) et menacée de disparition (Figure 12). Elle compte 456 espèces et une quinzaine de variétés. Elle se rencontre uniquement sur la côte Ouest en petits massifs épars à basse altitude. Son endémisme est de 57,5%. La fragilité de cette forêt, qui a largement régressé sous l'effet des défrichages et des feux, est due à l'envahissement des zones perturbées, par les espèces envahissantes introduites : *Acacia farnesiana* (« cassis »),

graminées diverses, ou espèces autochtones : *Casuarina collina* (« bois de fer »), *Acacia spirorbis* (« gaïac »), *Malaisia scandens* (« liane feu ») etc., qui par leur prolifération laissent peu de chances à la régénération naturelle des espèces de la forêt initiale (Jaffré et al., 2004).

Figure 12 : Forêt sèche (©LIVE-UNC-C. Blay)

- La forêt humide est conditionnée par une abondante pluviométrie et une faible amplitude thermique, d'où sa présence dans la chaîne centrale et sur la côte Est (Figure 13). Il existe les forêts de basse, moyenne altitude, les forêts denses sempervirentes humides d'altitude et forêts sempervirentes sur calcaire. Cette formation végétale recouvre environ 3900 km². L'étude de sa composition globale montre qu'elle est la formation végétale la plus riche en espèces (Jaffré *et al*., 1994). Le taux d'endémisme de cette flore est de 82,2% (Jaffré et al., 2004).

Figure 13 : Fougère arborescente en forêt humide de moyenne altitude (©LIVE-UNC-C. Blay)

- **La mangrove**

Elle couvre près de 200 km² du territoire. Elle se répartit principalement sur la côte Ouest de la Grande Terre (79% du littoral) et sur la côte Est (14% du littoral). Elle protège le littoral de l'érosion marine et retient les sédiments des terres. Elle est constituée principalement de Palétuviers (Figure 14). Cette formation ne compte qu'une vingtaine d'espèces, aucune endémique.

Figure 14 : Mangrove, palétuviers à échasse (©LIVE-UNC-C. Blay)

- **Les Savanes herbeuses**

Elles résultent de la dégradation des forêts par le feu (Figure 15). Elles sont dominées par le niaouli *(Melaleuca quinquenervia)*. Le taux d'endémisme y est faible.

Figure 15 : Savane herbeuse dominée par le niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) (©LIVE-UNC-C. Blay).

- **Le maquis minier**

Le maquis minier désigne « toutes formations végétales sur roches ultramafiques (péridotites et serpentines) n'appartenant pas aux forêts » (Brooks, 1987 ; Figure 16). Il couvre environ 4500 km^2. Le taux d'endémisme de cette formation est très fort 93,4% pour les dicotylédones. Sa description est plus détaillée dans la partie suivante.

Figure 16 : La formation végétale du maquis minier (©LIVE-UNC-C. Blay).

III/ Le milieu ultramafique

III.1/ Les roches ultramafiques : Définition

Les roches ultramafiques couvrent un peu moins d'1% de la surface de la terre (Proctor et Nagy, 1992). Elles ont pour origine la partie supérieure du manteau terrestre (Coleman et Jove, 1992) et sont riches en Mg et en Fe. Plus de 70% sont donc des minéraux ferromagnésiens. Les éléments minéraux sidérophiles tels Fe, Co, Cr, et Ni, sont en proportions importantes dans ces roches (Brooks, 1987). Par contre, les éléments Ca, N, P et K sont en faibles quantités, car ils ont peu d'affinités avec les minéraux ferromagnésiens. La couleur des sols est généralement foncée (noirâtre, rouge sombre), elle est due à la présence de fer oxydé et induit des températures de surface élevées par accumulation des radiations durant le jour (Brooks, 1987).

III.2/ Les roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie

- Mise en place des péridotites

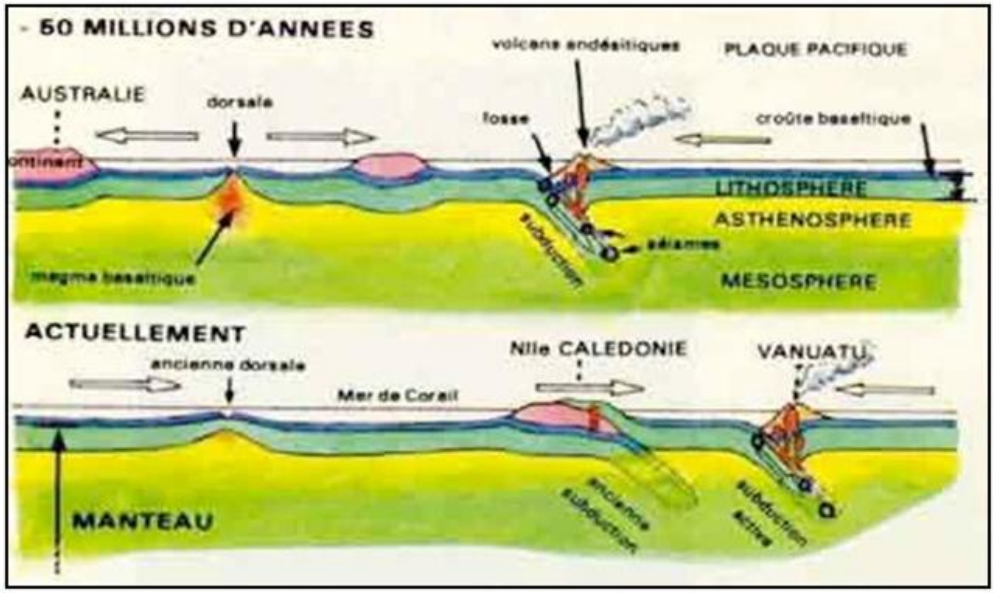


Figure 17 : Coupes schématiques illustrant les étapes de formation de la Nouvelle-Calédonie, notamment les phénomènes de subduction et d'obduction.

La Nouvelle-Calédonie (Grande Terre) est un fragment de croûte continentale qui appartenait au supercontinent Gondwana, constitué entre autres de l'Australie et de l'Antarctique (Figure 17). Ce fragment s'est détaché à la fin du Crétacé (environ – 90 Ma) et a lentement dérivé vers l'Est, accompagné de la Nouvelle-Zélande grâce à une dorsale aujourd'hui inactive située entre la Nouvelle-Calédonie et l'Australie.

Durant l'éocène supérieur (– 35-40 Ma), la plaque Indo-Australienne sur laquelle est située la Nouvelle-Calédonie se heurte à la plaque Pacifique et subducte. Lorsque la Grande Terre atteint cette zone de subduction, la plaque commence à s'enfoncer, mais, du fait de sa faible densité, elle bloque le mécanisme et force au contraire les roches de la croûte océanique de la plaque Pacifique à la chevaucher. C'est ainsi que vers – 37 Ma, à l'Eocène supérieur, deux fragments de lithosphère océanique se retrouvent charriés sur le socle continental calédonien : c'est l'obduction des massifs basaltiques et de la nappe péridotitique (Picard, 1999). De ce chevauchement ne va subsister que la partie basale érodée, les péridodites dont l'altération supergène a conduit à la formation des roches ultramafiques et des gisements de nickel actuels (Pelletier, 2001). Cet événement géologique a conditionné les caractéristiques pédologiques de la Nouvelle-Calédonie et par voie de conséquence, les originalités de la flore et de la faune locales.

- Altération des péridotites

Les péridotites représentent l'horizon primitif des roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. Elles sont riches en olivine (Mg_2SiO_4), orthopyroxène ($MgSiO_3$) et contiennent du Fe et des traces de Mn, Ni et Co (Pelletier, 1982). Ces roches ultrabasiques ont été sujettes aux processus d'altération dus aux eaux de pluies, aux modifications de pH et aux variations climatiques. L'ensemble de ces phénomènes conduit à un profil type d'altération qui peut varier en fonction de la roche mère, du degré d'altération et de l'érosion. La Figure 18 présente un schéma du profil d'altération des roches péridotitiques de Nouvelle-Calédonie.

- La roche mère péridotitique dont les fractures vont favoriser une altération pénétrante.
- L'horizon des saprolites qui conservent la structure des péridotites avec une diminution de la teneur en magnésie, une accumulation en fer et un enrichissement en nickel.
- La latérite jaune qui se superpose ensuite aux saprolites, et résultent de l'altération avancée des saprolites. Mg et Si n'existent pratiquement plus. Elles sont essentiellement constituées d'oxy et hydroxydes de fer plus ou moins cristallisés en goethite. La teneur en nickel est faible mais elle peut varier considérablement d'un endroit à l'autre (Becquer et al., 2002).
- La latérite rouge correspond à des horizons remaniés majoritairement composés de goethite et d'hématite où les structures de la roche mère sont effacées.
- La partie supérieure qui correspond aux résultats ultime de l'altération est une cuirasse constituée de goethite bien cristallisée et d'un peu d'hématite. C'est cette partie qu'un grand nombre d'êtres vivants ont colonisée et qui forme le « topsoil ». Celui-ci abrite toute la biodiversité néo-calédonienne.

Les processus conduisant à la concentration des métaux sont doubles (Latham, 1985) :

- La serpentinisation, processus d'altération à haute température (100-450°C) des péridotites hydratées permet le transfert des métaux des silicates primaires vers les serpentines (Manceau et al., 1987). Ce départ privilégié de certains éléments et notamment le Mg par simple mécanisme d'adsorption physique a pour conséquence un enrichissement résiduel en nickel dans les horizons inférieurs (Pelletier, 1982).

$$\underbrace{\text{Péridotite} + \text{Eau}}_{\text{Péridotite hydratée}} \rightarrow \underbrace{\text{Serpentine} + \text{Brucite}}_{\text{Péridotite serpentinisée}}$$

Cette réaction physico-chimique permet la conversion des péridotites en serpentine, minéral de surface silicaté et magnésien qui contient entre 12 et 13,5% d'eau (Brooks, 1987). ***On parle de sols serpentiniques ou de milieu serpentinique pour définir les écosystèmes des roches ultramafiques à serpentine mais on privilégiera l'emploi du terme ultramafique au sein de nos travaux pour éviter des confusions avec le terme serpentine qui définirait plutôt le minéral.***

- L'altération supergène qui intervient lors de la mise en affleurement des formations ultramafiques. Les températures élevées et les pluies conduisent à une altération géochimique. Lors de ces phénomènes d'altération, la roche se dissout et le nickel mis en solution est libéré. Ce dernier circulera dans les fractures des roches et enrichira ainsi les horizons inférieurs.

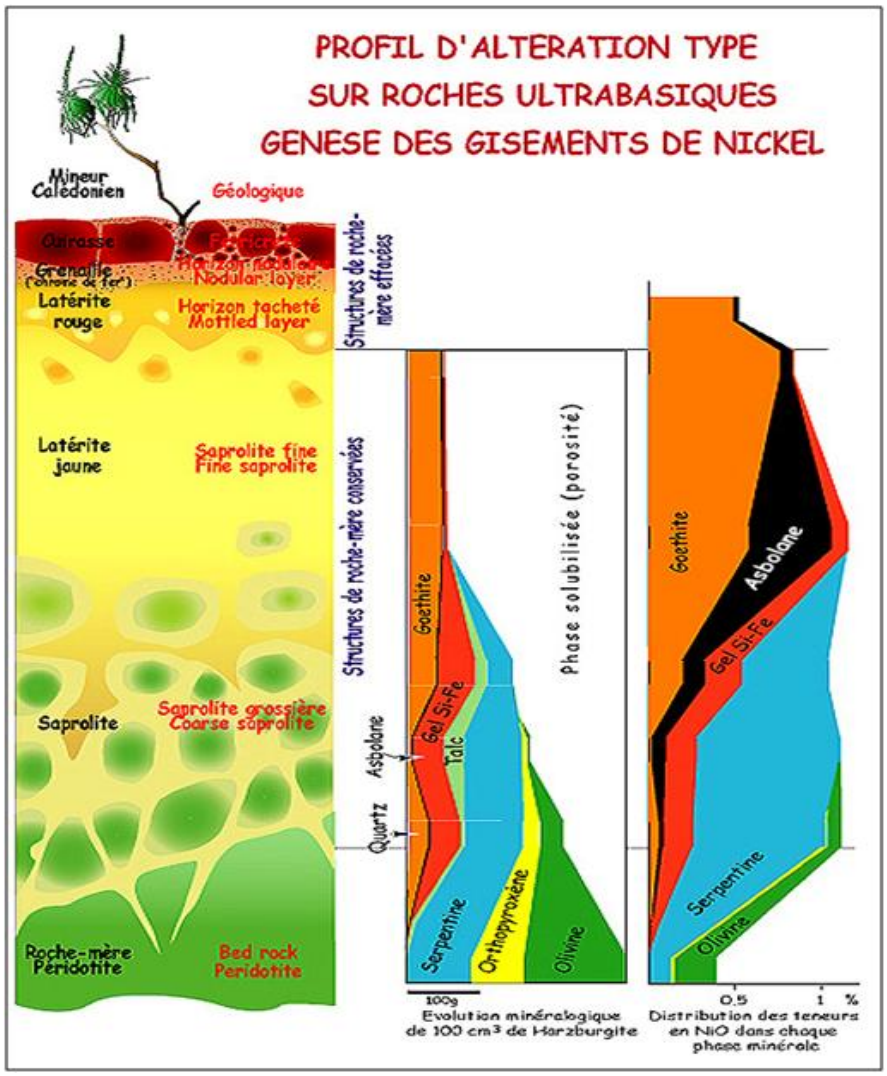


Figure 18 : Schéma du profil d'altération des roches péridotitiques en Nouvelle-Calédonie (Pelletier, 1990)

➢ Distribution des roches ultramafiques sur la Grande Terre

Les roches ultramafiques de la Nouvelle-Calédonie occupent actuellement 6900 km², c'est-à-dire près du tiers de la surface totale de la Grande Terre (Proctor, 2003). On peut distinguer 3 grandes régions (Figure 19) :

- Le grand Massif du Sud (5000 km^2), prolongé sur la côte Est en direction du nord.
- Le massif de la côte Ouest (1000 km^2), constitué d'un chapelet de petits massifs.
- Les massifs ultramafiques de la chaîne centrale, au niveau de Koné notamment (900 km^2)

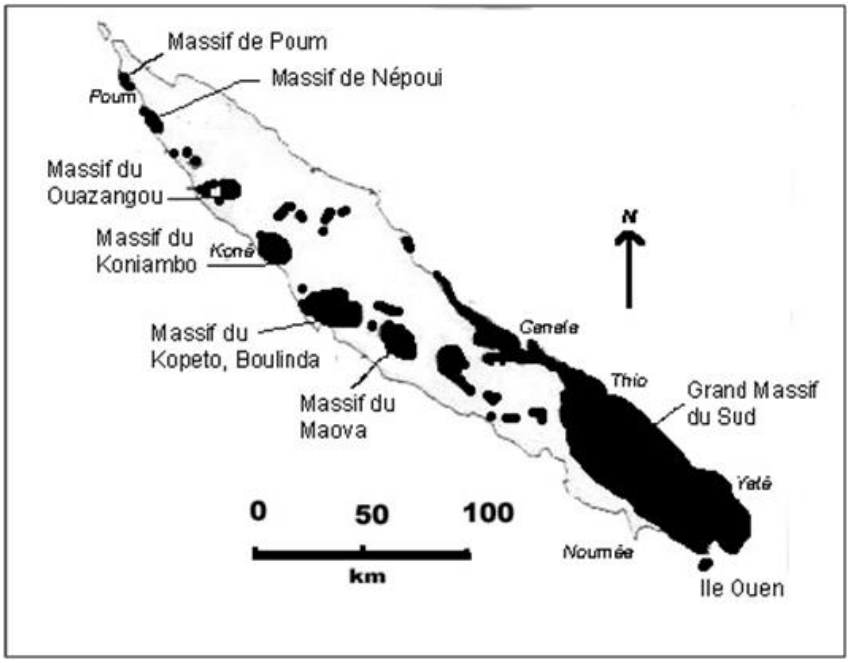


Figure 19 : Répartition des massifs de roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie (Jaffré et al., 1987)

➢ Les sols sur roches ultramafiques

Il existe deux principaux types de sols sur roches ultramafiques (Brooks, 1987)

- <u>Les sols bruns hypermagnésiens</u>

Ils occupent 40000ha (Cornuet et al., 1987). Ils sont noirs, peu profonds et peu développés. Ils occupent les bas versants des massifs ultrabasiques en zone de piedmont. La teneur en éléments traces métalliques (ETM) est importante (Ni, Co, Cr) tandis que la teneur

en Ca, K, et P est faible. La présence de smectite rend leur texture argileuse et conduit donc à une bonne rétention en eau de ces sols sauf en cas de forte pluie qui rendraient ces sols plastiques et imperméables.

- Les sols ferralitiques

Les sols ferralitiques représentent la majeure partie des sols issus des roches ultramafiques et sont le siège de l'exploitation minière. Ils sont principalement composés d'oxydes et d'hydroxydes de fer, ce qui les rend rouge brun. Leur teneur en Cr et Ni est forte (≈ 1 % de Ni sous forme de NiO). La concentration en magnésium est faible (< 1 %).
Le pH est neutre avec une tendance à l'alcalinisation (pH 7-8). La capacité d'échange cationique est faible (Coleman et Jove, 1992).
Bien que des forêts puissent se développer sur ces types de sols, la formation végétale qui se développe naturellement est le maquis minier, objet de notre étude.

III.3/ Les caractéristiques édaphiques du milieu ultramafique

Les facteurs édaphiques du milieu ultramafique sont caractérisés par :

- Une faible teneur en macroéléments essentiels :

La faible teneur en azote est la conséquence de la faible quantité de matière organique (Brooks, 1987), mais les teneurs en P, K, S, et Ca sont aussi déficitaires. La déficience en Ca est la plus limitante. Le rapport des teneurs en Ca/Mg est déséquilibré au profit du Mg. De plus, les pH élevés sont défavorables à l'absorption des éléments minéraux par les plantes (Brooks, 1987).

- Des fortes teneurs en éléments traces métalliques (ETM)

Les ETM sont les atomes de numéro atomique supérieur à 20. Dans les sols issus de roches ultramafiques, le chrome, le cobalt le manganèse et le nickel sont majoritaires. Le cobalt et le nickel ont une biodisponibilité similaire (Brooks, 1987).

- Faible taux de recyclage de la matière organique

Le feuillage, des espèces végétales se développant sur ce type de milieu, est petit et coriace, de plus, la faible teneur en eau de ces milieux ne permet pas une décomposition rapide de ce dernier. Ainsi, la couche de matière organique du sol est la plupart du temps très mince.

- Faible disponibilité de l'eau

L'altération des latérites profondes conduit à la formation d'une surface compacte et craquelée appelée cuirasse, impropre à une bonne rétention d'eau (Pelletier, 2001). Cette dernière limite la pénétration des racines (Bourdon et al., 1997) et induit un ruissellement important lors de fortes pluies, ces sols ont donc un faible pouvoir drainant.

- Interactions entre ces différents facteurs

Boyd et Martens (1992) ont pu corréler une bonne résistance à la sécheresse et une forte tolérance aux ETM. En effet, les effets induits sur une plante par de fortes concentrations en ETM sont similaires à ceux induits par la sécheresse (Barceló et Poschenrieder, 1990) :

- Réduction de la capacité d'absorption de la solution du sol.
- Réduction de la capacité à transporter les solutés (vaisseaux conducteurs).
- Ralentissement de la croissance végétative.
- Réduction de la transpiration.

L'hypothèse d'une corrélation possible de ces deux caractères n'a pas été suffisamment approfondie mais certains auteurs ont pu l'observer (Whittaker, 1954 ; Barceló et Poschenrieder, 1990). Barnabas et Arnott (1990) ont pu aussi noter qu'un apport de calcium pouvait induire une réduction des effets toxiques des ETM. Marschner (1995) explique ce phénomène par l'effet bénéfique du Ca dans la stabilité des parois pecto-cellulosiques et la compétition entre les ions de même charge pour leur fixation sur les sites de transport au niveau membranaire pour un transport de la solution du sol aux cellules racinaires. Ainsi, dans le milieu ultramafique pauvre en Ca^{2+}, l'absorption de Mg^{2+} est favorisée, il s'ensuit un rapport Ca/Mg généralement élevé en comparaison aux autres sols à syndrome serpentinique (Brooks, 1987) défavorable à la croissance des plantes (Robertson, 1992).

La quantité en matière organique est négativement corrélée à la toxicité des ETM, en effet, la présence de substance humique au niveau de la matière organique permet du fait de sa charge négative d'attirer les cations et notamment les ETM. Ces derniers sont ainsi moins disponibles pour la plante puisque étant sous forme ionique peu soluble (Persans et Salt, 2000). Dans le cas des terrains ultramafiques de la Nouvelle-Calédonie, la matière organique étant généralement en faible quantité, la biodisponibilité des ETM est importante (Brooks, 1987).

III.4/ Les formations végétales en milieu ultramafique

Du fait des conditions environnementales drastiques ayant cours sur les milieux ultramafiques, ces derniers sont très sélectifs et la végétation adaptée qui se développe sur ces milieux est dotée d'un endémisme élevé. 80 % des roches ultramafiques sont recouverts d'une formation végétale appelée maquis minier et 20 % sont occupés par des forêts (Brooks, 1987).

- La forêt sur roches ultramafiques

Elle occupe 600 km², on la retrouve à partir de 300 mètres d'altitude avec une pluviométrie de 1500 mm d'eau par an minimum (Proctor, 2003). Il existe de nombreuses similitudes entre ces forêts et les forêts humides sempervirentes (Jaffré et Veillon, 1990). Elles sont généralement dominées par les familles des Araucariaceae et des Nothofagaceae et les espèces herbacées sont des orchidées et des fougères (Proctor, 2003).

- Le maquis minier sur roches ultramafiques

Le maquis minier désigne en Nouvelle-Calédonie, « toute formation végétale, n'appartenant pas à la forêt, sur roches ultramafiques (péridotites et serpentinites) » (Brooks, 1987). Il s'agit de « formation héliophiles à feuilles coriaces et persistantes, arbustives plus ou moins buissonnantes ou ligno-herbacées à strate cypéracéenne dense » (Morat et al., 1986). Il occupe aujourd'hui 4500 km² allant du niveau de la mer à 1618 m d'altitude (Figure 20). Il existe trois types de maquis minier (Jaffré, 1980 ; Brooks, 1987) à savoir le maquis minier buissonneux, le maquis minier ligno-herbacé (beaucoup de Cyperaceae) et le maquis minier arbustif.

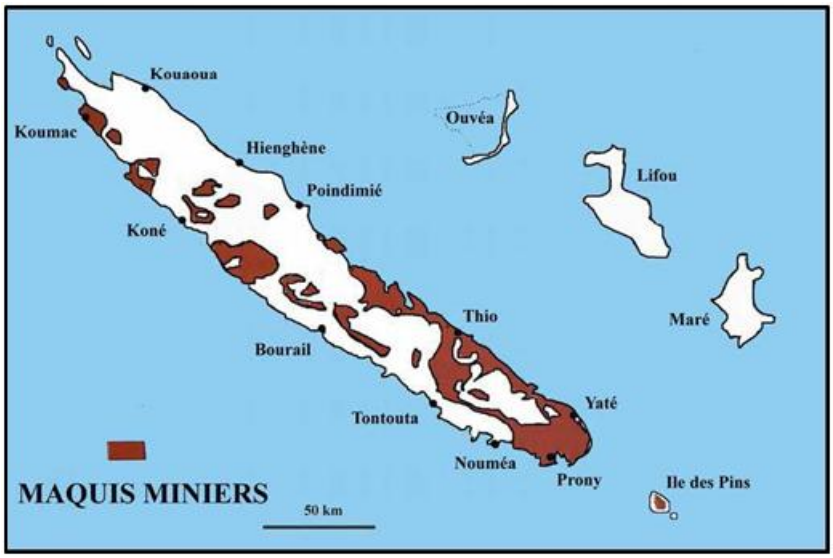


Figure 20 : Répartition des maquis miniers en Nouvelle-Calédonie

- Composition floristique

Le maquis minier constituant près de 80% des surfaces occupées en milieu ultramafique, nous nous bornerons à la description des espèces évoluant sur ces types de milieu. Ainsi, la flore des maquis est constituée de 103 familles distribuées en 321 genres et 1144 espèces (Figure 21). Le taux d'endémisme y est de 88,8% pour les plantes vasculaires. Elle est en seconde position après la forêt humide sempervirente en termes de nombre d'espèces indigènes mais en première position en termes d'endémisme (Jaffré et al., 2004). Le taux d'endémisme peut être même proche de 100% du fait des espèces inféodées à un seul massif. Les familles dominantes sont les Casuarinaceae, les Cunoniaceae, les Myrtaceae, les Rubiaceae, les Proteaceae, les Epacridaceae et les Cyperaceae (Jaffré et al., 1987 ; Jaffré et Veillon, 1994).

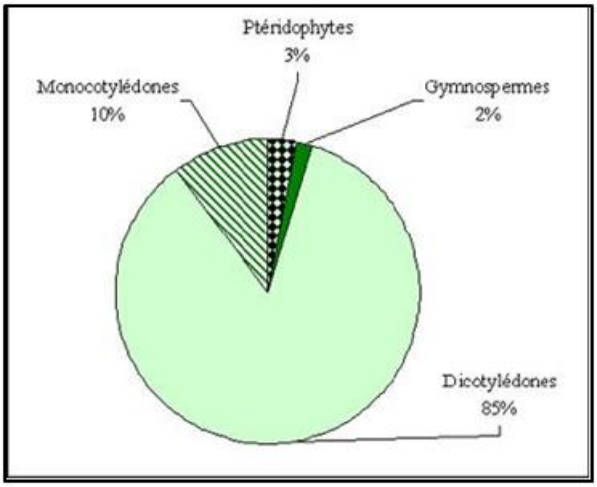


Figure 21 : Composition floristique globale du maquis minier néo-calédonien, en pourcentage du nombre total d'espèces du maquis minier (Jaffré et al., 2004).

- Ecologie des maquis minier

La compétition interspécifique sur les maquis minier est faible comparée aux milieux riches en nutriments. Cependant, les conditions drastiques du milieu limitent l'apport d'espèces mises à part celles adaptées ou accommodées et ceci induit de fait un fort taux d'endémisme ainsi que la faible présence d'espèces envahissantes (Brooks, 1987).

L'occurrence des espèces au sein des maquis miniers est tributaire de leur faculté à sécréter dans la rhizosphère des acides organiques, des sucres, des vitamines…toutes substances permettant de chélater les minéraux ; et de leur faculté à abriter des microorganismes symbiotiques (Dakora et Phillips, 2002).

Il existe une proportion importante d'espèces hyperaccumulatrices de nickel (Brooks, 1987). La croissance est extrêmement lente du fait des conditions nutritionnelles faibles. Proctor et

Nagy (1992) notent que cette faible croissance pourrait favoriser la tolérance à l'environnement défavorable. La stabilité floristique est importante (Morat et al., 1986), cependant, les dégâts occasionnés par l'action humaine (exploitation minière, plantation forestière, incendies répétés…) réduisent le développent des maquis miniers. Le feu est un paramètre important pour la phytogéographie des maquis miniers néo-calédoniens (Enright et al., 2001 ; McCoy et al., 1999), car ce dernier résulte essentiellement de la destruction du couvert forestier par le feu (Jaffré et Veillon, 1994). La biodiversité de certains microorganismes y a également été démontrée (Amir et Pineau, 1998 ; Saintpierre, 2001).

Le maquis minier est progressivement dégradé et son aire de répartition diminue du fait de l'exploitation forestière mais surtout, tout particulièrement aujourd'hui et plus encore dans les prochaines années, par les activités minières dont les enjeux économiques ne collent pas toujours avec la pérennité d'une exceptionnelle biodiversité.

III.5/ L'exploitation du nickel

- Bref aperçu

Je ne reviendrai pas sur la forte demande mondiale en nickel et ses intérêts ainsi que sur le positionnement de la Nouvelle-Calédonie dans le marché mondial du nickel. Cette partie a pour objectif de faire état, très brièvement de l'historique de l'extraction minière du nickel en Nouvelle-Calédonie, de l'évolution des différentes techniques employées et de ses impacts sur l'environnement.

Les premiers échantillons de nickel ont été découverts par l'ingénieur français Jules Garnier en 1864. Dès 1875, les premières exploitations minières se développent et vont conduire la Nouvelle-Calédonie parmi les premiers producteurs mondiaux de nickel (Estournès, 2001). L'exploitation du nickel n'a de cesse d'augmenter jusqu'au « boom du nickel » en 1960-1970 grâce à la mécanisation des techniques d'exploitation. Les minerais à forte teneur se raréfiant (15% de nickel), le perfectionnement des techniques a permis l'extraction de nickel de roches non utilisées auparavant (les latérites), car plus pauvres en nickel. L'exploitation minière est réalisée à ciel ouvert en gradins horizontaux de 3 à 6 m d'épaisseur. Les minerais exploités silicatés saprolitiques sont extraits par la pyrométallurgie

et les minerais oxydés latéritiques par l'hydrométallurgie (Pelletier, 2001). Ces minerais peuvent avoir une teneur de 2,5 à 3% (Pelletier, 2002).

- Impacts sur l'environnement

Avant 1950, l'utilisation de moyens rustiques a permis de limiter l'impact sur l'environnement. Après cette période, la mécanisation a amplifié les dégâts occasionnés. D'une manière générale, les dégâts sont principalement la conséquence des modes de prospection, la construction d'infrastructure et de routes nécessaires à l'exploitation proprement dite et au stockage des stériles (Bacon et al., 1993). La mise à nue du substratum et le ravinement des pluies torrentielles tropicales a conduit à une pollution des rivières, des plaines en aval et du lagon ainsi qu'à une stérilité des surfaces (Jaffré et Rigault, 1991a ; Figure 22). En milieu ultramafique dégradé par l'activité minière, la succession végétale naturelle est extrêmement lente (Jaffré et al., 1994), surtout sur les sites exposés et à fort dénivelés.

Figure 22 : Impacts de l'exploitation minière du nickel

- La prise de conscience

Dès les années 1960, une prise de conscience a commencé tant pour des raisons d'éthique environnementale, que pour préserver le patrimoine naturel. Les pistes d'accès aux mines ont été tout d'abord bordées de caniveaux d'évacuation des eaux et de décanteurs, les stériles ont été maintenues en terrasse (merlons) et les premiers programmes de réhabilitation ont été entrepris (Jost, 1966). Dès le début de l'exploitation, la réhabilitation comprend la mise en œuvre de méthodes de prospection peu destructives et de programmes de restauration végétale mais, la reconstitution d'un écosystème végétal viable reste encore problématique. Enfin, en 2003, la première conférence internationale sur la Préservation et la Restauration Ecologique en Environnement Tropical Minier s'est tenue à Nouméa.

IV/ La restauration écologique

IV.1/ Historique de la revégétalisation

La prise de conscience définie plus haut a réellement pris corps dans les années 1970 où les pollutions visuelles ont été importantes. En effet, de part l'amplification de l'exploitation minière due à la mécanisation des procédés (années 1960), les pollutions ont été de plus en plus importantes et ont alarmé les populations, les ONG environnementales, les pouvoirs publics et les sociétés minières. Ces dernières ont été parmi les premières à initier la revégétalisation en Nouvelle-Calédonie. Les premiers essais de revégétalisation ont été réalisés par le Centre Technique Forestier Tropical (CTFT) avec la collaboration de l'ORSTOM pour la société PENAMAX en 1971. Ces essais ainsi que les suivants réalisés en 1974-1976 par l'ORSTOM (Jaffré et Latham, 1976) puis par le CTFT de 1975 à 1981 ont privilégié l'utilisation de nombreuses espèces exotiques. A part le gaïac (*Acacia spirorbis*) et le bois de fer (*Casuarina collina*), très peu ont donné de bons résultats. Par la suite, de nombreux essais entre 1980 et les années 90 ont montré l'intérêt de l'utilisation des espèces endémiques pré-adaptées à ce type de milieu (Jaffré et Rigault 1991a,b ; Pelletier et Esterle 1995 ; Jaffré et Pelletier 1992 ; Jaffré et al. 1993 ; Jaffré et al. 1994b, 1997 ; Luçon et al. 1997 ; Sarrailh, 2001 ; McCoy et al. 1997, 2002).

Cette orientation a été progressivement mise en œuvre à la fois par les sociétés minières, la Province Sud et les communes et est actuellement la voie la plus propice en vue d'une réhabilitation efficace à plus ou moins long terme. Néanmoins, l'utilisation d'espèces exotiques est encore trop souvent adoptée pour revégétaliser de nombreux sites miniers, sans doute en raison de la facilité à se procurer des semences ou de jeunes plants et peut être en raison d'habitudes malheureusement encore ancrées chez certains acteurs de la revégétalisation. Les recherches et les expérimentations sont actuellement poursuivies, notamment par l'IAC et l'UNC, pour une meilleure domestication des espèces indigènes utilisées (étude des dormances, maitrise de la germination et de la conservation des graines) (Fogliani et al., 2004 ; Saintpierre-Bonnaccio et al., 2007 ; Zongo et al. 2007 ; Wulff et al. 2008), l'amélioration des techniques culturales, une meilleure connaissance des topsoils (L'Huillier, 2007) et des symbiotes (Perrier et al. 2006, Lagrange et al. 2009).

IV.2/ Succession végétale dans les maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie

Il a été estimé que la durée nécessaire pour passer d'un maquis ouvert à un maquis bas serait de 55 ans et de 75 ans pour atteindre un stade forestier après le passage d'un feu sur terrain minier (McCoy et al., 1999). Ces mêmes auteurs ont permis de mettre en évidence différents stades de la succession végétale secondaire après incendie et le rôle clé de l'utilisation d'espèces pionnières et notamment le *Gymnostoma deplancheanum.*

IV.3/ La restauration écologique en Nouvelle-Calédonie

IV.3.1/ Définition

La restauration écologique est définie par la *Society for ecological restoration* (SER, 2004) comme un processus qui assiste l'autoréparation d'un écosystème qui aura été dégradé, endommagé ou détruit. La SER la définit aussi comme « la transformation intentionnelle d'un milieu pour y rétablir l'écosystème considéré comme indigène et historique. Le but de cette intervention est de revenir à la structure, la diversité et la dynamique de cet écosystème ». La restauration est considérée ici *stricto sensu*.

Il est aussi proposé le terme de restauration *sensu lato*, qui qualifie le fait de stopper la dégradation et de tenter, en priorité, de rétablir les fonctions essentielles (production, autoreproduction, etc.) et la structure générale de l'écosystème préexistant.

La SER définit aussi la revégétalisation (ou végétalisation) comme étant un processus visant à reconstituer un couvert végétal d'un terrain dénudé par l'action de l'homme ou par l'effet de catastrophes naturelles. Les espèces végétales utilisées devraient être adaptées aux conditions du site à revégétaliser et suffisamment diversifiées, toutefois ce concept ne précise pas les objectifs à atteindre et les moyens à mettre en œuvre, laissant la voie ouverte à diverses interprétations. Ce terme est couramment et abusivement employé en Nouvelle-Calédonie.

IV.3.2/ Stratégie de la restauration écologique en Nouvelle-Calédonie

La stratégie de la restauration écologique des sites miniers en Nouvelle-Calédonie consiste à implanter un premier couvert de végétation pionnière, résistante et pérenne ou un

couvert de végétation d'espèce secondaire. Dans le premier cas, l'objectif est d'amorcer le processus de la succession secondaire et dans le second cas, il est d'accélérer ou de redynamiser la succession végétale secondaire. Chaque stade évolutif est constitué d'un noyau d'espèces qui y réalisent leur développement optimum mais la restauration intégrale d'un écosystème peut être lente et durer des centaines d'années. Les principaux facteurs limitant d'une restauration optimale sont la qualité physique, chimique et biologique des substrats à restaurer, la disponibilité des graines de plantes endémiques originaires des sites à restaurer et la germination sur sites de ces espèces endémiques qui reste lente et difficile (Lagrange, 2009).

En Nouvelle-Calédonie, trois techniques de revégétalisation sont principalement appliquées (Luçon et al., 1997 ; Pelletier, 2003) :

- L'ensemencement ou le semis hydraulique, procédé visant à projeter sur les surfaces à revégétaliser à l'aide d'un hydrosemoir (pompe montée sur un camion) un mélange de mulch, de colle végétale, de nutriments, d'engrais minéraux et organiques et de semences de diverses espèces (Figure 23). L'objectif est de fixer rapidement les sols et notamment ceux situés au niveau des zones à hauts dénivelés.
- La plantation d'espèces endémiques sur les talus, les décharges ou encore les anciens sites miniers. Ces espèces sont dites cicatricielles des maquis minier et sont censées amorcer une succession végétale secondaire.
- L'utilisation de « topsoil », le topsoil est la couche superficielle du sol, contenant la matière organique, la banque de graines du sol ainsi que les microorganismes du sol.

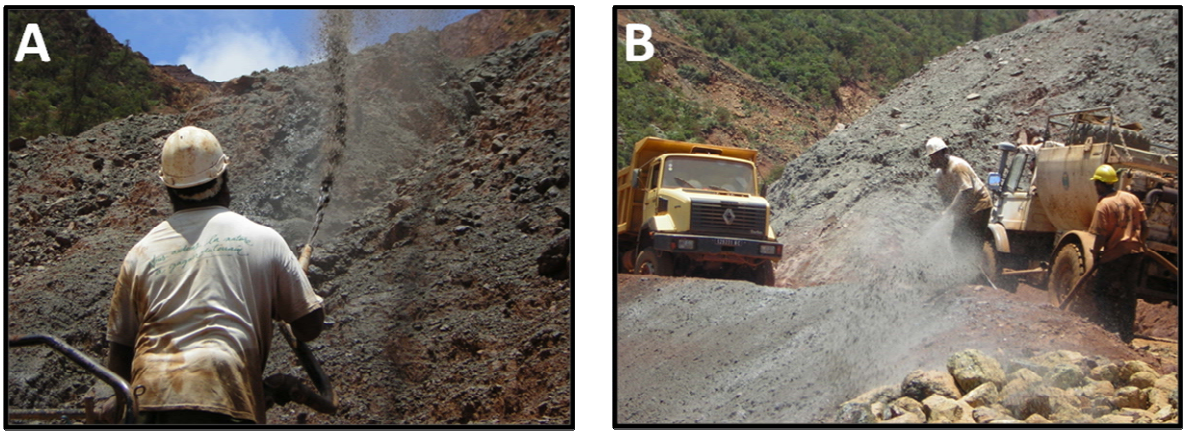


Figure 23 : Ensemencement hydraulique mené par la société SIRAS-Pacifique (© D. Saint-Pierre)

Ainsi, la restauration écologique des maquis miniers en Nouvelle-Calédonie est un processus qui se caractérise par plusieurs aspects et se concrétise de plusieurs manières (utilisation de topsoil, de mycorhizes…). Concernant nos travaux, nous avons principalement axé nos recherches sur l'étude des semences de maquis minier, que ce soit au niveau de leur structure, de leur composition biochimique, ainsi que de l'optimisation des conditions de germination, de la levée de dormance et de leur conservation.

V/ La multiplication sexuée

Cette partie est extraite pour une très grande part d'un chapitre rédigé conjointement par Fogliani B., L'Huillier L., Wulff A. et ***Zongo C.,*** *pour un ouvrage intitulé : Mine et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration (L'Huillier, 2010).*

Les plantes peuvent se régénérer et se multiplier selon deux voies : sexuée (à partir de graines) et asexuée (ou végétative). La multiplication sexuée demeure la voie à privilégier pour la restauration écologique pour plusieurs raisons :

- Les graines constituent des entités génétiques uniques, résultant d'un mélange du matériel génétique des parents. Les variations génétiques générées au sein des descendances se traduisent par une diversification des capacités d'adaptation de l'espèce aux conditions écologiques.

- Généralement, les graines sont produites en grand nombre et pour beaucoup d'espèces, sont disponibles chaque année (avec de nouvelles combinaisons génétiques).

- Les graines de nombreuses espèces peuvent être stockées sur de longues périodes, sous conditions sèches et froides (c'est le cas de la majorité des graines des maquis miniers) et dans un faible volume. Les conditions optimales restent cependant à déterminer.

- Sauf quelques rares cas, les virus ne sont pas transmis par les graines. La multiplication, par semis est donc un moyen simple d'obtenir des plantes saines.

- Les graines contiennent les cellules embryonnaires et les réserves de nutriments nécessaires aux premiers stades de développement de la plante, et sont généralement, plus résistantes aux stress environnementaux que les propagules végétatives.

La science de la biologie des graines se rapporte au développement et à la physiologie des graines jusqu'à ce qu'elles arrivent - ou n'arrivent pas - à germer. La connaissance de ces deux composantes est cruciale, tant pour une bonne gestion des ressources en graines que pour leur manipulation (collecte, stockage, prétraitement, germination…).
Les paragraphes qui suivent font le point sur les connaissances nécessaires et essentielles, sur la biologie des graines, l'accent étant mis sur les espèces indigènes des maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie chaque fois que cela est possible.

V.1/ Structures des fruits et des graines

La semence est un matériel idéal en ce qui concerne l'étude des adaptations en réponse aux contraintes du milieu. En effet, cette structure est en elle-même une adaptation et elle est apparue dans l'évolution chez les gymnospermes et les angiospermes. A l'époque déjà, Charles Darwin avait définit la diversification importante et rapide des semences d'angiosperme durant le crétacé comme un « abominable mystère ». Les plantes à graines ont un avantage adaptatif indéniable et évoluent dans une large gamme d'habitats et elles dominent aujourd'hui la flore mondiale. Ce succès évolutif est en partie dû à la graine qui représente la plus spectaculaire innovation dans l'évolution des plantes terrestres.

Les termes fruits et graines sont souvent employés indifféremment, pourtant ils ne doivent pas être confondus. En effet, ces deux structures ne dérivent pas des mêmes pièces florales. Le fruit résulte du développement de l'ovaire après fécondation. Il renferme donc la ou les graines. Au terme des transformations, la paroi du fruit ou péricarpe qui provient directement de la paroi de l'ovaire comporte généralement trois parties, à savoir, de l'extérieur, vers l'intérieur : l'épicarpe (ou exocarpe), le mésocarpe et l'endocarpe. Le fruit peut être sec (péricarpe sec) ou charnu (péricarpe chargé d'eau à maturité). Les fruits secs peuvent être déhiscents (s'ouvrant à maturité comme les gousses ou les capsules), ou indéhiscents (ne s'ouvrant pas à maturité, c'est le cas des akènes). Certains fruits secs peuvent présenter des adaptations particulières aux conditions du milieu tels les feux comme les fruits sérotineux qui ne libèrent les semences qu'après passage d'un feu ou suite à des températures élevées. Quant aux fruits charnus, toujours indéhiscents, ils sont divisés en deux groupes : les drupes contenant un noyau (endocarpe lignifié) et un mésocarpe charnu entourant la ou les graines, et les baies sans noyau (avec un endocarpe et un mésocarpe charnus). La principale

fonction du fruit est de protéger les graines jusqu'à leur complet développement et souvent de contribuer à leur dispersion (Black et al., 2006 ; Baskin et Baskin, 1998).

La graine, *stricto sensu,* défini le stade ultime de développement de l'ovule après fécondation. Elle ne comporte pas d'annexes provenant d'autres structures florales mais peut être munie d'une excroissance (arille, caroncule…) ou de structures de dissémination (aile, …). La graine peut être définie selon le mode de dispersion qu'elle présente, ainsi, on distingue la zoochorie (animaux), l'anémochorie (vent), la barochorie (gravité), l'hydrochorie (eau), et encore plus spécifiquement la myrméchorie (fourmis) (Fenner et Thompson, 2005). Malgré leurs diversités morphologiques, les graines sont toutes fondamentalement constituées de la même façon. Elles comprennent un embryon noyé (graine albuminée) ou non (graine exalbuminée) dans un tissu de réserve de nature variable, entouré d'un ou de deux téguments. A partir de ces dernières, Corner (1976) a définit une classification des différentes semences à téguments épais selon que la graine développe un testa important (testal) ou un tegmen important (tegmique).

L'embryon est la structure essentielle de la graine, car c'est lui qui donne naissance à la nouvelle plante lors de la germination. Les réserves, qu'elles soient localisées dans les cotylédons de l'embryon (graine exalbuminée) ou dans des tissus spécialisés (endosperme haploïde chez les Gymnospermes, périsperme diploïde et albumen triploïde chez les Angiospermes), assurent la croissance hétérotrophe de la plantule issue de la germination. Baskin et Baskin (2004); Black et al. (2006) et Finch-Savage et Leubner-Metzger (2006) ont repris la classification des graines initiée par Martin (1946) basée sur la forme et la taille des embryons. Forbis et al. en 2002 a complété cette classification en se basant cette fois-ci sur le rapport Embryon/Graine et en étudiant l'aspect phylogénétique de cette dernière.

Les téguments protègent plus ou moins efficacement l'embryon et jouent un rôle physiologique très important en contrôlant sa germination.

V.2/ Types de graines

La teneur en eau des graines, en particulier, définit différents types de semences : orthodoxes, intermédiaires ou récalcitrantes (Côme et Corbineau, 2000).

- Les premières subissent une phase de déshydratation au cours de leur formation et peuvent tolérer une déshydratation importante jusqu'à 5 % d'humidité sans perte de viabilité. Plus encore, leur déshydratation permet d'accroître leur longévité. Il a ainsi été possible de faire germer après 1300 ans, certaines graines de Lotus de Chine. Elles représentent une très grande partie des semences existantes : une estimation de 88,7 % a été faite pour près de 12000 espèces répertoriées au travers du monde (Yoshinaga et Walters, 2004).

- Les semences intermédiaires sont en fait des semences de type orthodoxe mais dont la déshydratation en dessous de 8% d'humidité est néfaste avec une perte de viabilité constatée. Il s'agit souvent de graines tropicales albuminées huileuses contenues dans des fruits charnus (café, papayer, palmier à huile…).

- Enfin s'agissant des graines récalcitrantes, certaines espèces en particulier de forêts tropicales à subtropicales présentent des semences riches en eau à maturité (35 à 70 % par exemple pour les graines d'*Araucaria* au moment de leur collecte) et dont une forte dessiccation conduit très rapidement a la mort.

V.3/ La germination des graines

V.3.1/ Processus de germination

La germination est la phase de développement végétal qui permet de passer du stade de graine quiescente au stade de jeune plant. La germination *stricto sensu* est terminée lorsque la longueur de la radicule émergeante est de 1 mm. L'ensemble du processus de germination se déroule en trois phases successives (Figure 24) :

- Imbibition (phase 1) : la germination débute par une intense absorption d'eau conduisant à une forte hydratation des tissus lors de la phase 1. Les activités métaboliques reprennent et la respiration est très active.

- Germination *stricto sensu* (phase 2) : cette seconde phase est caractérisée par une stabilisation de l'hydratation et de la respiration à un niveau élevé. Pendant cette phase, la graine peut être réversiblement déshydratée et réhydratée sans dommage apparent pour sa viabilité. Cette phase s'achève avec l'émergence de la radicule hors des téguments séminaux.

- Croissance (phase 3) : phase caractérisée par la reprise de l'absorption de l'eau et l'augmentation de la consommation d'O_2 équivalent à un processus de croissance affectant la radicule puis l'épicotyle (tigelle).

Pour germer une graine doit donc se trouver dans un environnement favorable caractérisé par un taux d'humidité élevé, une plage de température particulière, la présence d'oxygène et la présence ou l'absence de lumière.

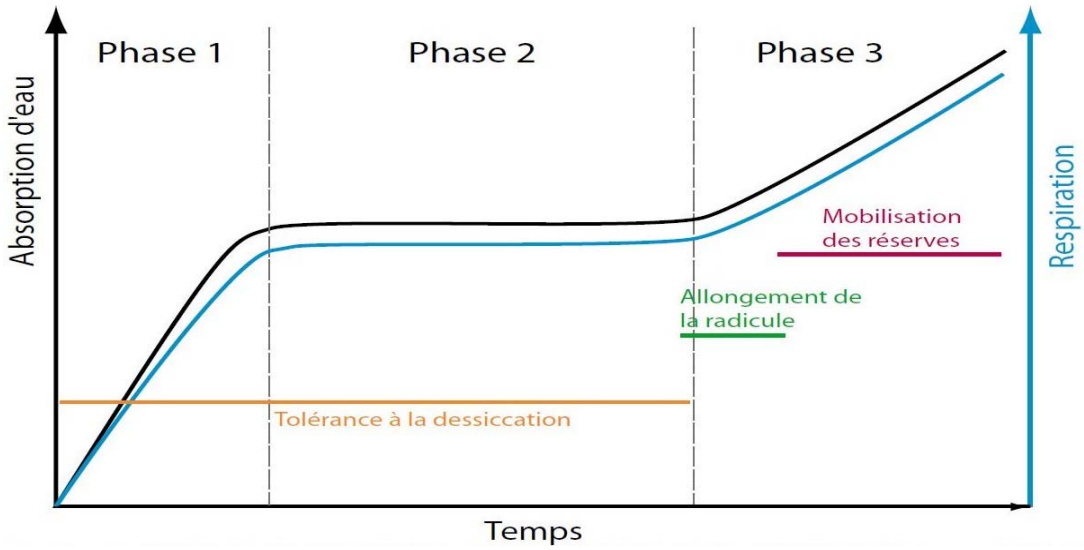


Figure 24 : Les différentes phases de la germination (d'après L'Huillier et al., 2010)

V.3.2/ Dormances

Une graine viable est qualifiée de dormante lorsqu'elle n'a pas la capacité de germer dans des conditions environnementales qui devraient apparemment permettre la germination (Baskin et Baskin, 2004). On parle de dormance lorsqu'il faut attendre plus de 4 semaines avant la première percée radiculaire et/ou lorsque la germination est étalée dans le temps (plus de 2 mois pour un lot de graines) (Baskin et Baskin, 1998). Ce blocage provient de la semence et non des conditions environnementales, ce qui distingue la dormance de la quiescence. Les espèces végétales ont développé des stratégies de dormance afin de permettre à leurs graines de germer seulement quand les conditions optimales pour leur développement sont réunies. Ces stratégies permettent également de faciliter la dispersion des graines. Il existe selon Nikolaeva (1969, 1977) deux grands types de dormance organique, à savoir les dormances endogènes, qui sont induites par des caractéristiques particulières de l'embryon, et les dormances exogènes engendrées par des caractéristiques particulières des structures entourant

l'embryon (albumen, péricarpe…). La photosensibilité est relevée comme un troisième type de dormance par certains auteurs (Come et Corbineau, 2002) : dans ce cas la germination dépend de la lumière (peut être stimulée, ou inhibée ou ne pas être influencée), et seules les structures dans lesquelles l'embryon se trouve enfermé sont responsables de cette dormance (les embryons dénudés peuvent germer indifféremment en présence ou en absence de lumière).

Plus récemment, de nombreux auteurs se sont accordés pour distinguer cinq classes de dormance : physiologique, morphologique, morpho-physiologique, physique et combinée (physique + physiologique) (Baskin et Baskin, 1998, 2004 ; Black *et al.,* 2006). D'autres dormances font toujours l'objet de discussions quant à leur statut. Ces classes sont détaillées ci-dessous :

- Physiologique (PD) : Cette dormance est causée par un mécanisme physiologique d'inhibition de l'embryon empêchant l'émergence de la radicule. C'est la forme de dormance la plus commune, qui peut être divisées en 3 niveaux : PD profonde, intermédiaire et non profonde. Il a été mis en évidence que dans certains cas, c'est le ratio entre l'acide abscissique (ABA) et l'acide gibbérellique (GA_3) qui peut être a l'origine de cette dormance (Finch-Savage et Leubner-Metzger*,* 2006). Ce ratio peut varier en fonction de facteurs environnementaux (température, …). Cette dormance peut être levée de différentes manières, sachant que chaque espèce peut nécessiter un ou plusieurs de ces traitements. Une première méthode est d'utiliser les techniques de stratification qui consistent à mettre les graines dans un environnement humide et froid ou chaud pendant une certaine période (de 5 jours à plusieurs mois) puis de changer la température (fonction du climat dans lequel se développe l'espèce). Cette dormance peut aussi être levée par l'utilisation d'agents chimiques tels que le nitrate de potassium (KNO_3), la thio-urée, la kinétine et les gibbérellines (GA_s) mais aussi par certains gaz comme le CO_2 et l'éthylène.

- Morphologique (MD) : Dans ce cas, c'est l'embryon de la graine qui n'est pas encore totalement développé. La graine nécessite une période de maturation après avoir été détachée du pied mère afin de permettre le développement total de l'embryon. Cette maturation doit s'effectuer dans un environnement humide avec une plage de températures comprises entre 15 et 30° C en fonction des espèces. Certaines espèces

présentant ce type de dormance nécessitent soit de la lumière, soit de l'obscurité pour germer. Les acides gibbérelliques (GA_3) peuvent augmenter le pourcentage et la vitesse de germination (Wulff et al., 2009).

- Morpho-physiologique (MPD) : Certaines espèces soumises à une dormance morphologique peuvent aussi présenter une dormance physiologique combinée. Cette double dormance est présente chez de nombreuses familles. Pour la lever, il est nécessaire de mettre en place des stratifications au froid et/ou au chaud, avant ou après la maturation de l'embryon. Pour certaines graines, il faut même une stratification alternant le chaud et le froid pendant plusieurs années.

- Physique (PY) : Cette forme de dormance est induite par une imperméabilité du tégument de la graine ou du péricarpe du fruit, empêchant l'embryon de s'hydrater et/ou de s'oxygéner et de commencer sa germination. Dans le milieu naturel, cette dormance est levée par l'action des micro-organismes du sol, par des alternances de périodes humides et sèches permettant la fragilisation du tégument ou du péricarpe, mais aussi par l'ingestion du fruit par un animal. Cette dormance peut être levée par une scarification mécanique (papier abrasif, scarificateur mécanique, scalpel,…), chimique (H_2SO_4, H_2O_2, solvants organiques, …) ou bien par chauffage à sec ou humide (bain d'eau chaude).

- Physique et physiologique (PY+PD) : dans ce type de dormance combinée, le tégument de la graine ou le péricarpe du fruit sont imperméables à l'eau (dormance physique) et l'embryon est également physiologiquement dormant.

Cette classification de Baskin et Baskin (2004) ne considère pas les dormances chimique et mécanique en tant que véritables dormances alors qu'elles étaient identifiées comme telles par le passé. Ces auteurs indiquent qu'il est difficile de les distinguer de la dormance physiologique dans la plupart des cas. D'autres auteurs au contraire semblent les maintenir comme dormances à part entière :

- Chimique : Nikolaeva (1969) avait introduit la notion de dormance chimique résultant de la présence d'inhibiteurs dans le péricarpe. Dans ce cas la graine peut germer

seulement après que le péricarpe ait été enlevé ou lessivé. Baskin et Baskin (1998) avaient repris cette notion mais plus tard ils ont préféré la regrouper avec la dormance physiologique (Baskin et Baskin, 2004). Cette dormance peut avoir comme origine la présence d'ABA dans les tissus du fruit et de la graine. Les acides phénoliques, les tannins et les coumarines peuvent aussi bloquer la germination de certaines graines, toutefois leurs rôles spécifiques n'ont pas été mis en évidence. Certains phénols peuvent bloquer l'entrée de l'oxygène dans la graine, ne permettant pas la germination. Il est possible que certaines substances inhibitrices aient un rôle de protection contre la prédation ou les infections bactériennes.

- Mécanique : Nikolaeva (1969, 1977) avait décrit cette dormance sur des fruits à endocarpe induré, pouvant permettre l'imbibition de la graine mais bloquant l'expansion de l'embryon (observé parmi les *Apocynaceae, Anacardiaceae, Elaeocarpaceae*...). Certains fruits sont imperméables à l'eau, ce qui les rapproche de la dormance physique. D'autres fruits sont perméables à l'eau mais la germination de leur(s) graine(s) ne se fait pas jusqu'à ce qu'ils reçoivent un traitement de levée de dormance (stratification au froid par exemple). Pour l'auteur, aucune évidence ne suggère que l'endocarpe soit un obstacle mécanique à la germination. En d'autres termes, une fois que la dormance de l'embryon est levée, ce dernier a la capacité de germer. Baskin et Baskin (2004) considèrent que ce type de dormance est à intégrer dans la dormance physiologique. En effet, la majorité des graines de ce type présente également une dormance physiologique, les deux dormances étant difficiles à distinguer. Toutefois, la germination de quelques espèces peut être bloquée par une restriction mécanique des structures du fruit (endocarpe, mésocarpe). La consultation de la bibliographie montre que des tendances de dormance peuvent être mises en évidence selon la famille.

VI/ Le nickel dans les plantes

VI.1/ Généralités (biodisponibilités, absorption, transport et phytotoxicité du nickel)

Les sources de nickel dans les milieux naturels sont les sols serpentiniques, les amendements de culture et les rejets des activités minières (Farago et Cole, 1988 ; McIlveen

et Negusanti, 1994). Dans les sols des anciens sites miniers, la teneur en nickel est certes variable mais toujours assez forte. Jaffré (1977) a rapporté des valeurs de concentration totale en nickel de sols de stations situées dans le périmètre d'anciennes mines de nickel allant de 57 à 507 $\mu gNi.gMS^{-1}$. Brooks (1987) rapporte des concentrations en nickel dans les sols serpentiniques de 80 à 7100 $\mu gNi.gMS^{-1}$. Dans le milieu naturel, la forme la plus commune du nickel est la forme ionique de cation bivalent Ni^{2+}. Le nickel est défini comme un élément essentiel pour les plantes (Eskew et al., 1983 ; Brown et al., 1987), mais il y est présent à l'état d'élément trace métallique.

Chez les plantes, la principale force motrice de l'absorption des éléments minéraux est le gradient de potentiel électrique de la membrane plasmique des cellules racinaires. Celui-ci étant négatif, il facilite fortement l'entrée des cations (Welch, 1995). Ce potentiel électrique membranaire est entretenu par l'activité des symports et des antiports (Larcher, 1995). Les transporteurs membranaires du Ni n'ont pas été identifiés mais il est possible qu'ils ne soient pas spécifiques de ce cation (Cataldo et al., 1978). Les besoins en nickel dépendent des espèces et des écotypes. La stimulation d'activités enzymatiques par le nickel peut être une réponse à un stress, ou bien le résultat d'effets bénéfiques de ce dernier. L'uréase est le seul enzyme connu comportant du nickel chez les végétaux (2 atomes de Ni pour chacune des 6 sous-unités).

Le nickel est un élément mobile, il circule facilement dans le xylème et le phloème, et est généralement sous forme soluble aqueuse (Farago et Cole, 1988 ; McIlveen et Negusanti, 1994). Très peu de connaissances sont acquises sur les formes du nickel dans le phloème (Welch, 1995). Dans les organismes vivants, le nickel est chimiquement associé au Fe et au Co (Marschner, 1995). Son état ionique le plus commun dans les milieux biologiques est Ni^{2+}. La teneur moyenne en nickel dans les organes végétatifs varie entre 0,1 et 10 $\mu gNi.gMS^{-1}$ (Farago et Cole, 1988 ; Marschner, 1995). Cependant, cette teneur est généralement plus élevée chez les espèces de milieu serpentinique, avec des teneurs avoisinant 100 $\mu g.gMS^{-1}$ (Reeves, 1992 ; Brooks, 1987). Jaffré et al. (1977) ont rapporté des teneurs foliaires en Ni supérieures à 30 $\mu g.gMS^{-1}$ chez 34 espèces se développant sur d'anciens sites miniers de Nouvelle-Calédonie, la majorité d'entre elles ayant des teneurs très proches de 100 $\mu gNi.gMS^{-1}$. La répartition du nickel entre les racines et la partie aérienne est fonction de l'espèce (Krupa et al., 2002) et il n'y a pas de règle générale.

Beaucoup de cations bivalents sont stockés dans l'apoplasme, fixés entre autre sur des sites réactifs de ligands de la paroi pecto-cellulosique : carbonyl, hydroxyl, thiol, phénolique, N-amino, N-amide, carboxylique (Welch, 1995).

La phyto-toxicité liée à la présence excessive du nickel est un stress abiotique chimique dit métallique. Elle se traduit chez les espèces tolérantes au nickel pour des concentrations supérieures à 10 $\mu gNi.gMS^{-1}$. Cette valeur phyto-critique peut être des centaines de fois plus élevée pour les espèces hyperaccumulatrices de Ni (Uren, 1992).

VI.2/ Distribution et localisation dans la plante entière

Le nickel est l'élément le plus hyperaccumulé par les plantes (Brooks et al., 1998 ; Bidwell et al., 2002). Au niveau des feuilles, le nickel est principalement localisé dans les couches de cellules épidermiques. Cette localisation a pu se vérifier chez plusieurs espèces à l'aide d'analyses en cryo-MEB/EDX, comme le *Thlaspi pindicum* (Brassicaceae) (Psaras et al., 2000), *T. goesingense* (Küpper et al., 2001) et *Hybanthus floribundus* (Violaceae) (Bidwell et al., 2004), toutes hyperaccumulatrices de nickel. Le nickel a également été localisé plus intensément à la base des trichomes de feuilles d'espèces hyperaccumulatrices de Ni présentant cette structure tels *Alyssum bertolonii*, *A. lesbiacum* (Küpper et al., 2001), *A. corsicum, A. fallcinium, A. murale* (Broadhurst et al., 2004). Ainsi, le nickel est accumulé dans des cellules physiologiquement plus « inertes ».

VI.3/ Spéciation du nickel

Comme pour la localisation de l'élément Ni au sein de la plante, plusieurs études ont été consacrées à la spéciation du nickel. Ainsi, l'étude par HPLC de *Stackhousia tryonii* (Celastraceae) a permis de mettre en évidence au sein des feuilles de l'acide malique majoritaire comparé à l'acide citrique et oxalique. La quantité importante d'acide malique serait suffisante pour chélater le nickel. Au sein de la sève, des acides aminés et notamment, la glutamine a pu être retrouvée complexant le nickel mais le lien avec le transport n'a pas pu être établi (Bhatia et al., 2005). L'acide malique a aussi été majoritairement détecté chez 7 espèces hyperaccumulatrice de Ni néo-calédoniennes dont *Psychotria douarrei* (Rubiaceae) (Kersten et al. 1980) par méthodes chromatographiques. Plus récemment, Montargnès-

Pelletier et al. (2008) ont aussi retrouvé de l'acide malique dans les feuilles de 3 plantes hyperaccumulatrices de Ni, à savoir, *Alyssum murale, Leptoplax emarginata* et *Thlaspi caerulescens,* à l'aide d'une étude de XAS (Spectroscopie d'absorption des rayons X).
Lee et al. (1977) ont pu détecter du citrate de nickel dans les feuilles de *Sebertia acuminata* (Sapotaceae), *Hybanthus austrocaledonicus*, *Homalium francii, H. guillainii, H. kanaliense* (Salicaceae) à l'aide de techniques chromatographiques et de spectroscopie infrarouge.
Perrier et al. (2004) ont montré la présence de complexes Ni-acétylacétonate dans les feuilles de *Sebertia acuminata*. L'étude spécifique du latex de *S. acuminata* a montré mise à part, la présence importante du complexe Ni-acide citrique, l'occurrence de Ni-nicotianamine (Schaumlöffel et al., 2003), précurseur des phytosidérophores (Callahan et al., 2006). Ce complexe Ni-nicotianamine a aussi été retrouvé dans des racines de *Thlaspi caerulescens* (Vacchina et al., 2003) et des complexes Ni-histidine dans la sève du xylème d'*Alyssum lesbiacum* (Krämer et al., 1996). Enfin, très récemment, Pouschat (2009), a également montré la présence de nickel chélaté par un carboxylate di-monodendate de type Mn(II)-acétate$_2$ ainsi que du nickel chélaté par un carboxylate bidentate de type Ni(II)-acétylacétonate dans les feuilles de *Phyllanthus favieri*, espèce hyperaccumulatrice de nickel. Elle a aussi reporté la présence majoritaire au sein des tiges de cette même espèce de complexes bidentates, de type Mn(II)-malate, -citrate et Ni(II)-acétylacétonate.

Ainsi, le nickel se présente sous différentes formes dans la plante selon qu'il soit stocké ou transporté. Le stockage serait alors majoritairement sous formes de carboxylate de nickel tandis que concernant le transport, la forme de ce dernier semble encore mal établie et nécessite des études plus complètes afin de mieux le définir.

VI.4/ Les stratégies de réponse au stress nickélifère

VI.4.1/ Stress métallifère et perception du stress

La plante va réagir de deux manières suivant la nature, l'intensité, la durée, les répétitions et le temps entre chaque répétition ainsi que la combinaison de ces facteurs (Gaspar et al., 2002). En général, le stress métallifère va induire des réponses dans le système biologique (activations/inhibitions de processus physiologiques) puis un état physiologique et/ou morphologique permettant de survivre au stress. Ces réponses sont de deux sortes :

- Réponses non fixées génétiquement au travers de phénotypes différents dans le cas d'accommodation.
- Lorsque le stress apparaît prévisionnel, les réponses sont le plus souvent fixées génétiquement au travers d'écotypes ou de variété d'espèces, on parle d'adaptation.

VI.4.2/ Les réponses au stress nickélifère

Gaspar et al. (2002) a définit deux principaux types de réponses physiologiques de résistance au stress métallifères et dans notre cas, nickélifère (Figure 25) :

- Réponse de tolérance

Le stress environnemental est subi. Le nickel est absorbé et assimilé par la plante. Si le stress est trop fort, l'activité métabolique est réduite. Parmi les réponses de tolérance, Baker (1981) comprend l'accumulation et l'indication :

- Accumulation et hyperaccumulation

Les espèces accumulatrices de Ni ont des teneurs entre 100 et 1000µgNi.gMS^{-1}, et les teneurs d'hyperaccumulatrices sont supérieures à 1000µgNi.gMS^{-1} (Brooks et al., 1977). Jaffré (1980) définit même des espèces hypernickelophore pour des concentrations supérieures à 10 000µgNi.gMS^{-1}. Il existe un gradient de concentration du nickel des racines vers les feuilles chez les espèces hyperaccumulatrices (Boyd et Martens, 1992).

Deux types de mécanismes permettent l'hyperaccumulation du Ni :

- ✓ La concentration du métal comme dans le latex de *Sebertia acuminata* (Sapotaceae) où le nickel est tellement concentré que la sève en est devenue bleu. La concentration en Ni est de 11% soit 20 à 26 % de la matière sèche de l'ensemble des solutés du latex (Reeves, 1992). Perrier et al. (2004) ont pu mettre en évidence que la forme chimique sous laquelle le Ni est complexé est majoritairement le citrate. Le latex transporte et stocke le nickel phytotoxique au sein des vacuoles foliaires avant d'être éliminé par la chute des feuilles (Vergnano Gambi et al., 1982 ; Larcher, 1995).
- ✓ La séquestration du métal induite par la complexation via un ligand du nickel. Les ligands sont des acides organiques (malate, citrate, l'histidine et des phytochélatines (Rauser, 1990) et des phytosidérophores (Vacchina et al., 2003). Le Ni peut induire une disponibilité accrue des acides organiques, en effet, Farago et Cole (1988) ont montré que la malate déshydrogénase pouvait être désactivée par le nickel et induire

une accumulation de malate qui complexerait ce dernier afin de le stocker dans les vacuoles. Au niveau cytoplasmique, le Ni peut être séquestré par des ions inorganiques, des protéines, des polypeptides et des enzymes de faible poids moléculaire. Avant son entrée dans le cytoplasme, les parois pecto-cellulosiques jouent un rôle de barrière (Macfie et al., 1994). La séquestration est aussi bien connue au niveau des zones épidermiques et sub-épidermiques (Persans et Salt, 2000 ; Psaras et al., 2000) des feuilles d'espèces hyperaccumulatrices de Ni que dans les trichomes (Küpper et al. 2001) des feuilles mais pour cette dernière, les résultats fournis sont contradictoires.

- L'indication

Les espèces accumulent le Ni proportionnellement à la concentration en Ni dans le substrat. Dans ce cas, il n'y a probablement pas de mécanismes spécifiques relatifs à l'absorption du Ni.

- Réponse d'exclusion

Le stress environnemental est évité. Le nickel pénètre peu dans la plante. Il existe dans ce cas des mécanismes d'exclusion du nickel pour limiter son absorption (barrières électrochimiques au niveau des cellules racinaires, ligands secrétés dans la rhizosphère), ou bien l'organisme rentre dans un état d'activité métabolique réduite.

Les espèces peuvent posséder une combinaison de mécanismes de tolérance et d'exclusion, selon les organes et les tissus, ainsi qu'en fonction du stade de développement (Baker, 1981).

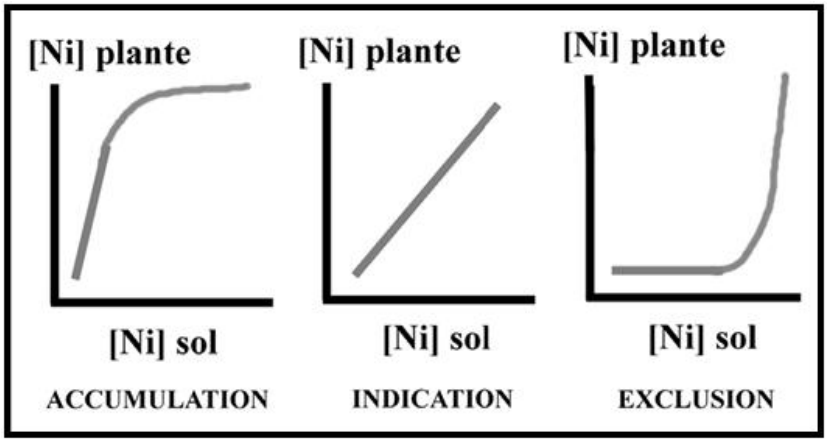


Figure 25 : Stratégie de résistance au stress métallifère (d'après Baker, 1981)

VI.5/ Nickel et semence

Très peu d'études ont cerné les problématiques alliant le nickel et les semences d'espèces hyperaccumulatrices de Ni. Aussi bien dans les études concernant la répartition des éléments minéraux au sein des semences, que les études focalisant sur la spéciation du nickel et enfin, les études menées sur l'effet du nickel et la germination des semences, très peu de travaux ont traité ces domaines. Et pourtant, la semence est une étape charnière dans le cycle de vie d'une plante puisqu'elle représente l'ensemble du matériel génétique nécessaire à la mise en place d'un nouvel individu. Ainsi, mise à part les phénomènes d'accommodation explicités plus haut et s'exprimant par des phénotypes différents, la semence est un matériel idéal concernant l'étude des mécanismes adaptatifs développés par ces dernières. De plus, la possibilité d'exprimer ces mécanismes dans des conditions contrôlées permet de mieux apprécier ces phénomènes adaptatifs.

VI.5.1/ Nickel dans les semences

La quantité de nickel dans les semences est suffisante pour de nombreuses espèces afin de compléter leur cycle de développement sans avoir à en absorber du milieu extérieur (Welch, 1995). Marschner (1995) a pu noter que chez certaines espèces, le nickel est préférentiellement accumulé dans les graines. Les quelques études menées sur ce sujet ont concerné des espèces cultivées afin d'évaluer leur qualité alimentaire (Lange-Hesse et al., 1994 ; Gupta et al., 2000 ; He et al., 2000). Lange-Hesse et al. (1994) ont noté la présence de nickel lié à des protéines de faible poids moléculaire (< 0,5 kDa) dans les grains de pois mais ils n'ont pas pu définir de sites spécifiques de ce métal. Gupta et al. (2000) ont pu noter que l'addition de chlorure de nickel dans le milieu de croissance (de 5 à 40 ppm) induit une augmentation de la teneur en huiles dans les graines de *Brassica juncea* et notamment des acides gras linoléique et palmitique. La localisation du nickel au sein de la semence a été très peu étudiée, cependant quelques travaux ont pu montrer que la concentration en nickel au sein des semences d'*Alyssum heldreichii (*1880 $\mu g.gMS^{-1}$) est négligeable comparée aux autres parties de la plante (Brooks, 1998). Witkowski et al. (1997) ont rapporté des quantités importantes de nickel au niveau de l'axe embryonnaire de *Burkea africana*. Przybylowicz et al. (1995) ont noté la présence de nickel dans la partie du fruit de l'hyperaccumulateur de Ni, *Senecio coronatus,* couvrant la radicule et dans la radicule elle-même. Psaras et Manetas (2001) ont noté pour leur part, la présence de nickel dans la partie du micropyle du tégument

de la graine de *Thlaspi pindicum,* une hyperaccumulatrice de nickel ainsi que dans l'épiderme des cotylédons.

VI.5.2/ Nickel et germination

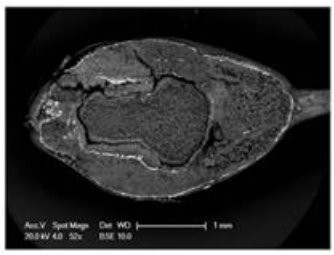
Les apports de nickel à de faibles concentrations peuvent être bénéfiques pour la mise en place de la germination, tandis qu'une concentration élevée serait inhibitrice (Singh et al., 1990 ; Homer et al., 1991 ; Rout et al., 2000 ; Peralta et al., 2001). Cet aspect est un argument favorable au caractère essentiel du nickel. De plus, certains auteurs ont pu noter que les semences provenant d'espèces évoluant dans le milieu ultramafique ou dans des sols pollués étaient plus à même de germer par la suite dans le même type de milieu riche en métaux et notamment le nickel (Rout et al., 2000). Fogliani (2003) a également noté une capacité germinative plus importante des semences d'une espèce hyperaccumulatrice de nickel (*Geissois pruinosa*) comparé à des semences d'une espèce non hyperaccumulatrice (*Cunonia macrophylla*) lors d'un apport d'amendement croissant de solution de nickel révélant de fait la tolérance acquise des graines et plantules de *G. pruinosa*.

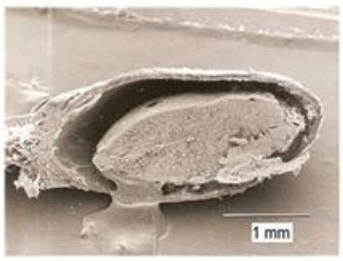
Bhatia et al. (2005) notent également la nécessité d'un traitement par after-ripening afin de lever la dormance de semences de *Stackhousia tryonii*. L'auteur fait le lien entre la levée de dormance et la composition en acide gras et en particulier l'occurrence d'acide gras à chaine courte. Ainsi, les acides gras à chaîne courte, remplacés durant un after-ripening par des acides gras monoinsaturés puis polyinsaturés, pourraient développer un effet inhibiteur sur la germination, cette explication reste encore à être vérifiée.

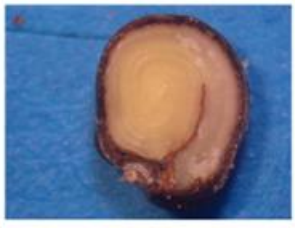
Le taux de germination des semences d'orge, augmente linéairement avec la teneur en Ni si cette dernière ne dépasse pas 100ng.gMS^{-1} (Marschner, 1995).

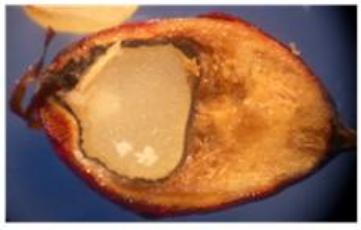
CHAPITRE 1 :

BIOLOGIE DES SEMENCES D'ESPECES PIONNIERES CANDIDATES A LA REVEGETALISATION : REPONSE AUX FACTEURS CLIMATIQUES









CHAPITRE 1 :
BIOLOGIE DES SEMENCES D'ESPECES PIONNIERES CANDIDATES A LA REVEGETALISATION : REPONSE AUX FACTEURS CLIMATIQUES

I/ Introduction

La Nouvelle-Calédonie est un laboratoire « grandeur nature » idéal pour ce qui est de l'étude de la biodiversité en général. Ce constat s'applique également à la physiologie et l'écologie des adaptations mises en place par les semences. En effet, la Nouvelle-Calédonie est originale dans le fait qu'elle regroupe sur une petite surface, une très grande variabilité de microclimats ainsi qu'une large gamme de substrats. D'un point de vue floristique, ces caractéristiques sont à l'origine d'une endémicité importante mais également, comme le note Jaffré (1980), d'un taux important de micro-endémisme. Les mécanismes qui sont à l'origine de cet endémisme et de ce micro-endémisme importants sont tributaires des conditions environnementales (climatiques et édaphiques) originales définit plus haut comme étant le « syndrome serpentinique ». Ces conditions environnementales extrêmes ayant cours dans le maquis minier néo-calédonien tendent à supposer l'existence de mécanismes d'adaptations propres aux semences d'espèces évoluant sur ces types de milieu.

Afin de mieux appréhender l'étude des caractères biologiques et écologiques des semences d'espèces évoluant dans le maquis minier, il est bon de rappeler succinctement les facteurs importants caractérisant ce milieu :

- un faible taux de recyclage de la matière organique qui par voie de conséquence conduit à une couche de surface (topsoil) pratiquement inexistante voire quasi-nulle
- une faible teneur en macroéléments essentiels dont la plus marquée et la plus limitante est probablement la déficience en Ca
- une forte teneur en éléments trace métalliques comme le Ni, le Co, le Cr, le Mn
- une faible disponibilité de l'eau due à des sols faiblement rétenteurs
- une végétation à feuillage prédisposée au passage d'incendies d'origine naturelle, qui se sont amplifiés depuis l'arrivée de l'homme
- des températures variables et saisonnières
- des précipitations qui peuvent être importantes mais souvent intermittentes.

Afin de faire face à ces contraintes extrêmes, les semences d'espèces du maquis minier ont certainement dû développer des mécanismes physiologiques, biologiques et écologiques adaptatifs qu'il faut absolument appréhender afin d'optimiser au mieux leurs utilisations dans les différentes techniques de restauration écologique.

Ainsi, cette première partie est consacrée à l'étude des semences de 45 espèces issues du milieu ultramafique provenant majoritairement du maquis minier. Elle avait pour objectif la caractérisation des principales données biologiques de ces semences. Ces données biologiques comprennent des données sur la structure anatomique (externe, interne, ultrastructure), la composition des réserves séminales (caractérisation des métabolites primaires : protéines, glucides, lipides), la germination des semences et les dormances en présence, et enfin la conservation de ces dernières.

L'objectif clairement affiché était double. Outre la compréhension des mécanismes adaptatifs développés par ces espèces face au milieu dans lequel elles se développent, ces données ont été exploitées afin de proposer des protocoles fiables permettant d'optimiser la germination de ces semences dans le cadre de leur utilisation dans le domaine de la revégétalisation. C'est la raison pour laquelle notre attention s'est portée en particulier sur des espèces dites pionnières.

Ces travaux ont permis la réalisation *in fine* de fiches techniques descriptives plus ou moins complètes selon la semence considérée. En effet, la réalité du terrain et du laboratoire (disponibilité en graines, opportunité de stages en laboratoires extérieurs, …) ont conduit à des études plus ou moins approfondies. Cependant, trois d'entre-elles ont été particulièrement étudiées du fait de leur utilisation traditionnelle dans la revégétalisation des terrains dégradés par l'activité minière. Leur choix a également été induit par le fait qu'elles interviennent dans différents stades de la succession écologique attribuée au maquis miniers. En effet, comme développé dans l'état de l'art, l'objectif principal est d'établir dans un premier temps, sur les terrains dégradés par l'activité minière, une végétation robuste et pérenne. Pour cela l'utilisation d'herbacées et de ligneux locaux pionniers dont les rôles principaux sont la stabilisation des sols, la restauration des zones dégradées et à une moindre échelle le maintien de la richesse de la biodiversité, apparaissent inévitables.

Les trois espèces retenues sont:

- ***Gahnia aspera*** (R. Br.) Spengel., herbacée native appartenant à la famille des Cypéracées, pionnière, qui se développe sur terrains miniers et qui est considérée comme une bonne candidate à la révégétalisation par le service revégétalisation de KNS (Koniambo Nickel SAS)
- ***Alphitonia neocaledonica*** (Schltr.) Guillaumin, espèce ligneuse appartenant à la famille des Rhamnacées qui est considérée comme l'une des espèces prioritaires pour la revégétalisation (Jaffré et Pelletier, 1992) du fait qu'elle croît rapidement en association avec *Frankia* sp. qui accroit le taux d'azote dans le sol (Gauthier et al., 2000). Par ailleurs, cette dernière réapparait après des feux (McCoy et al., 1999) et produit des fruits en abondance (Jaffré et Pelletier, 1992).
- ***Grevillea exul* spp. *exul*** (Lindley), espèce ligneuse de la famille des Proteaceae retenue par Jaffré et al. (1993) comme une espèce à « bon comportement » lors de sa réimplantation en milieu dégradé. Cette dernière appartient à une classe d'espèce dont la taille augmente de près de 50% après un an d'implantation.

Ce chapitre sera divisé en :

- une partie « résultats » spécifique de l'étude de trois semences qui intégrera des publications soumises et/ou acceptée
- une partie résultats transversaux et discussion où les résultats présentés dans les fiches techniques seront analysés et interprétés afin de dégager les grands traits des adaptations développées
- une conclusion et des perspectives.

II/ Résultats détaillés obtenus sur les semences de 3 espèces candidates à la revégétalisation des terrains miniers dégradés.

Cette étude a permis, via l'ensemble des analyses décrites dans la partie expérimentale, d'établir des fiches descriptives plus ou moins complètes selon la qualité et la disponibilité de 45 semences d'espèces de milieu ultramafique. Ces fiches sont en annexe et présentent l'ensemble des résultats obtenus pour chaque espèce étudiée. Par ailleurs, les résultats obtenus concernant les trois espèces pionnières phares des sols issus de roche ultramafique sont présentés en détails ci-dessous. Concernant l'étude de *Gahnia aspera* (R. Br.) Spengel et d'*Alphitonia neocaledonica* (Schltr.) Guillaumin, de la famille des Cypéracées

et des Rhamnacées respectivement, les résultats sont présentés sous forme d'articles puisqu'elles ont fait l'objet de deux publications acceptées et/ou soumises. S'agissant de *Grevillea exul* ssp. *exul* (Lindley) de la famille des Proteacées, les résultats sont présentés à la suite du document en troisième point de cette partie.

II.1/ Résultats de l'étude détaillée concernant les semences d'une espèce de Cyperaceae pionnière : Gahnia aspera (R. Br.) Spengel

II.1.1/ Etat de l'art

La famille des Cyperaceae est extrêmement importante dans le cortège floristique des maquis minier néo-calédoniens puisqu'elle représente la composante essentielle de la strate herbacée des terrains miniers en Nouvelle-Calédonie. Leur utilisation est donc centrale au sein des différentes stratégies de restauration écologique des terrains miniers dégradés. En effet, l'utilisation de Cyperaceae permet un développement rapide du couvert végétal et limite ainsi l'érosion des sols dénudés et la pollution des milieux juxtaposés. Aucune étude spécifique complète n'a été menée jusqu'à présent sur la structure et la dormance des semences de *Gahnia aspera*. Seuls quelques auteurs ont pu mener quelques études éparses sur des espèces de la famille de Cyperaceae de Nouvelle-Calédonie mais aucune n'a traité spécifiquement de *Gahnia aspera*. Ainsi, on peut reporter les études menées par Jaffré et Rigault (1989) ainsi que par Jaffré et Pelletier (1992) au niveau local. D'un point de vue international, sans être exhaustif, les travaux de Schütz (2000), de Leck et Schütz (2005), de Amen et Bonde (1964) et des Baskin et Baskin (1971) peuvent être cités, cependant la plupart ont concerné plus particulièrement des espèces de Cyperaceae de milieu tempéré. Ainsi, d'une part les études concernant les Cyperaceae tropicales sont trop peu nombreuses et sont à promouvoir et d'autre part, du fait de l'importance des Cyperaceae dans la strate herbacée ayant cours dans le maquis minier néo-calédonien, il semble primordial d'accumuler des données biologiques, physiologiques et écologiques, concernant ces espèces afin de mieux appréhender leur utilisation au sein des différentes opérations de restauration écologique et notamment concernant l'utilisation de la technique de l'ensemencement hydraulique.

II.1.2/ Publication concernant les semences de *Gahnia aspera*

Cette publication intitulée « Detailed analysis of Cyperaceae seeds used for nickel mining sites revegetation in New Caledonia : the case of Gahnia aspera (R. Br.) Spengel. » sera soumise au journal « Ecological restoration » avant la fin du mois de mai 2010. Pour des raisons de lisibilité et afin d'alléger le manuscript, seules les parties résultats et discussions seront présentés, de plus, les références bibliographiques ont été intégrés dans la bibliographie finale.

Extrait de la publication :

3. Results

3.1 Phenology and geographical distribution

Gahnia aspera is found from sea level up to an altitude of 500 m and is distributed throughout the main island. Figure 1 shows its geographical distribution along the "Grande Terre". No samples were collected from the Loyalty Islands. The herbarium samples show that *G. aspera* is mainly localised on ultramafic environment but can also be present in dry forest.

Analysis of herbarium vouchers at the IRD Centre in Noumea showed *Gahnia aspera*'s tufted profusely fructifies in May (Figs 2A, B).

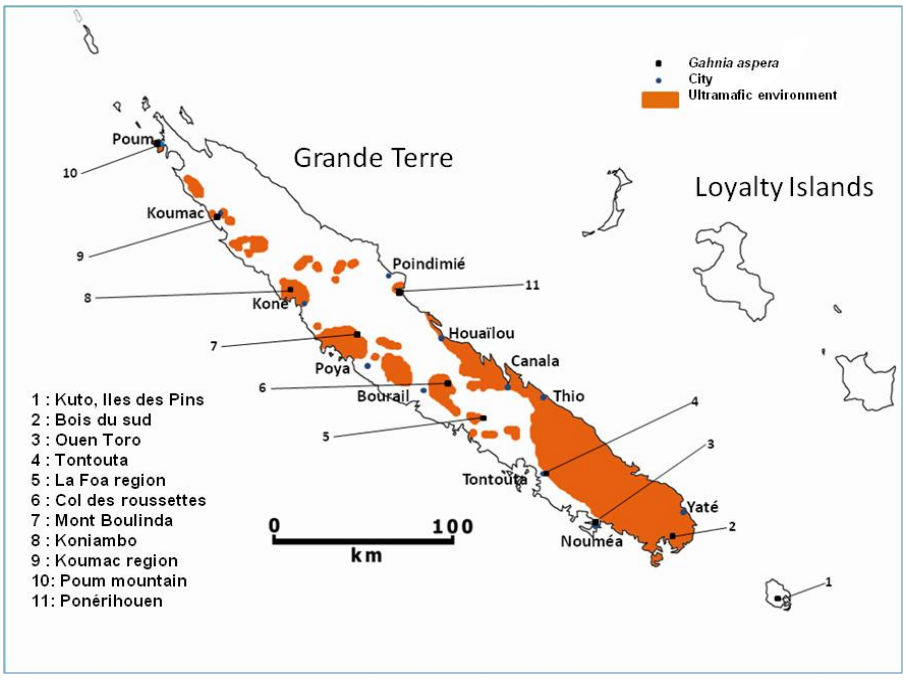


Fig. 1. Geographical distribution of *Gahnia aspera* on the main island of New Caledonia in relation to the position of ultramafic soils. Data is based on herbarium vouchers deposited at the IRD Noumea (NOU).

Table 1
Mean precipitation, temperature and relative humidity for the 2005-2009 at Vavouto region (point 8 on fig. 1) calculated from raw data provided by METEO-FRANCE.

Month	Mean precipitation (mm)	Mean temperature (°C)	Mean relative humidity (%)
January	147.2	26.5	75.3
February	63.1	26.3	75.5
March	277.4	25.5	82.2
April	81.6	24.7	81.2
May	108.8	22.0	76.2
June	86.1	21.4	75.4
July	46.2	20.1	72.6
August	46.5	20.1	73.4
September	22.8	21.4	72.6
October	6.2	22.5	72.1
November	39.6	24.4	72.8
December	69.7	25.5	68.6

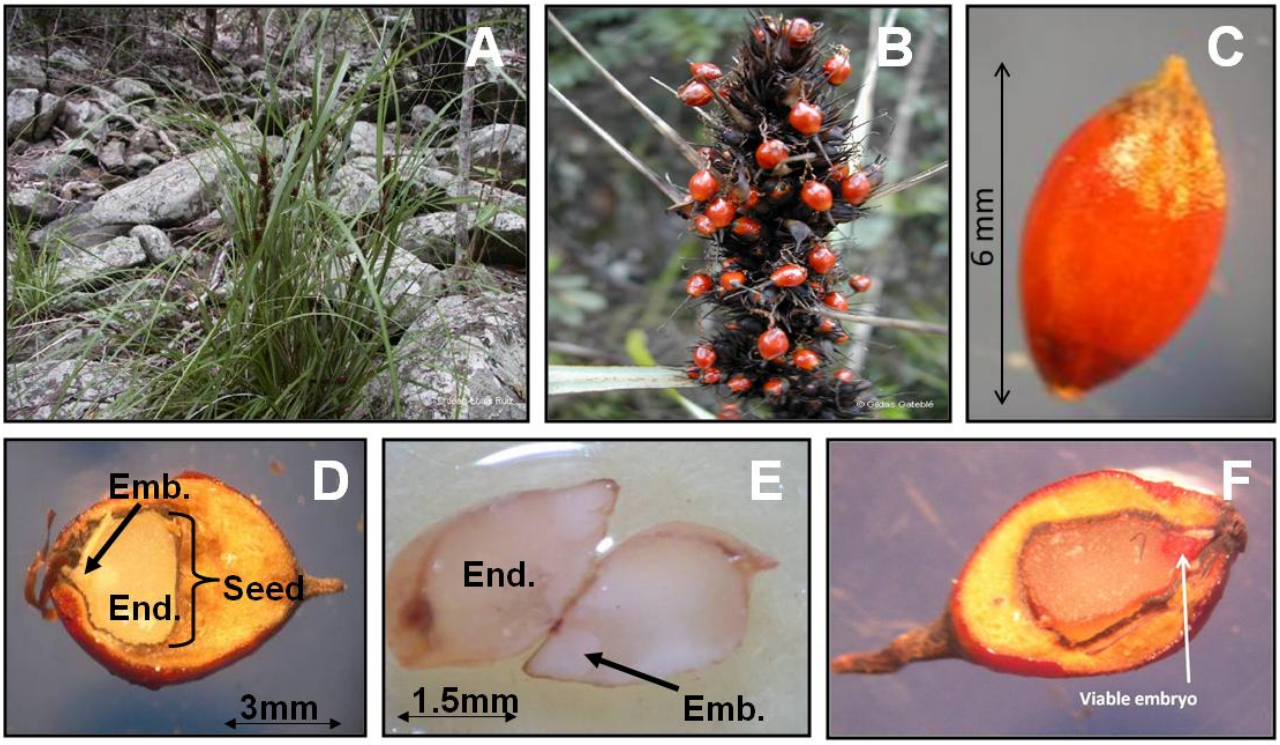


Fig. 2. Photographic illustrations of the *Gahnia aspera* plant, fruits and seeds. A: an adult plant; B: ear of mature fruits; C : whole fruit (x40); D: fruit longitudinal section (x45); E: non viable seed longitudinal section (x45); F: fruit longitudinal section showing a viable seed coloured with TTC. End.: Endosperm ; Emb.: Embryo

3.2 Fruit and seed characteristics

G. aspera fruit is an ovoid achene (2-4 x 3-6mm) with an estimated weight of 21.5 ± 0.4 mg. Achene moisture content has been evaluated at 7.29 ± 1.18 % (Table 2). It is bright red-orange to brown at maturity (Fig. 2C). Once separated from the achene, the seed size is about 1-3 x 1,5-3 mm (Fig. 2D). As for the fruit, the seed is ovoid and brown. The longitudinal section shows an endosperm as well as an embryo well differentiated (Fig. 2E). The embryo is about 1mm long and is localised at one extremity of the seed, near the hilum.

Table 2
Gahnia aspera seed characteristics. (E.S ratio: embryo to seed length ratio; SD: standard deviation)

Average weight for 100 seeds (g ± SD)	Range of seed length (mm ± SD)	Range of seed width (mm ± SD)	E.S ratio	Viability (% ± SD)	Moisture content (% ± SD)
2.15 ± 0.04	1-3	1.5-3	0.3	44 ± 5.6	7.29 ± 1.18

Scanning electron microscopy observations of longitudinal section of *G. aspera* achene shows an important woody pericarp (Fig. 3A). This latter is divided into the epicarp (Figs. 3C, 3D), the mesocarp (Fig. 3E, 3F) and the endocarp (Fig. 3E). The inner part of epicarp cells is embedded with silica material as confirmed by X-ray analysis (Fig. 3B). This silica substance is also present on the outer part on the endocarp. Silica substance fill vessel transversally oriented. The thick pericarp is dissociated from the testa (Fig. 3A, 3E). This observation also confirms seeds are endospermate.

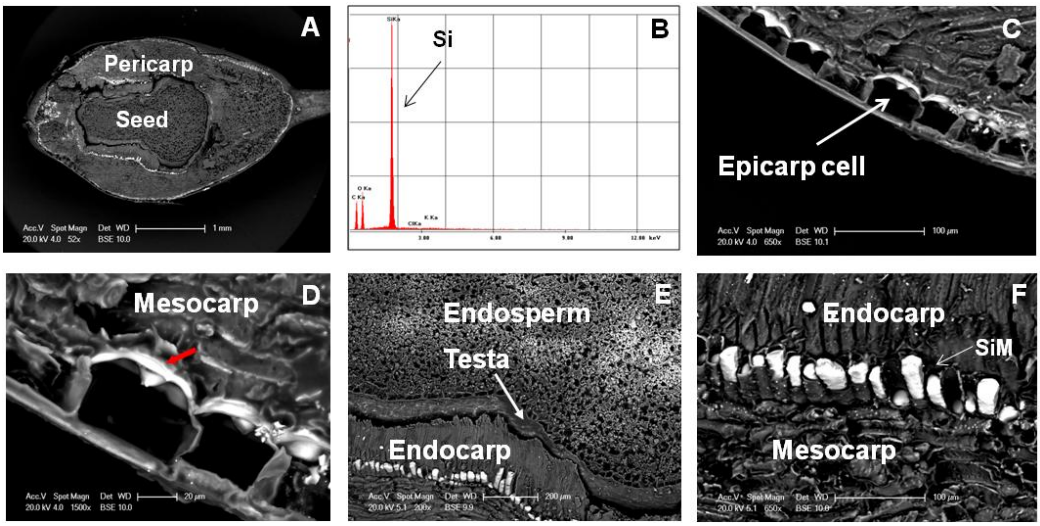


Fig. 3. SEM photographic illustrations of the *Gahnia aspera* fruit (achene). A: fruit longitudinal section; B: x-ray analysis of the red arrow zone of the photographic D; C: outermost layer of the pericarp of fruits i.e. epicarp; D: Zoom on two epicarp cells; E: Inner part of the fruit i.e. endocarp and seed endosperm; F: Zoom of the mesocarp-endocarp region showing silica material (SiM).

3.3 Viability and viable seed selection by floating

The viability of *G. aspera* seed initial lot was evaluated at 44 ± 5.56%. We judged such a proportion of viable seeds was too weak to carry out the subsequent experiments, and tested the feasibility of separating viable seeds by immersion.

As shown in table 2, this method of separation by immersion is efficient for *G. aspera* as all the viable seeds (44% of the initial lot) sink to the bottom of the testing vial leading to a better quality lot, which showed 76% viability. Figure 2F shows viable *G. aspera* seed with both the radicle and cotyledon stained tissues. In contrast, a non viable seed shows no staining of any parts of the seed tissue (Fig. 2E).

3.4 Germination requirements

All germination trials were investigated on the initial seed lot (44% viability). No germination was recorded after 60 days of incubation for the untreated control seeds at 25°C under continuous light. Amongst the thirteen treatments used to optimise germination (Fig. 4A), the sandpaper scarification gave the best results with a germination percentage of 29 ± 6.8% after 60 days. It also allowed a faster germination as it leads to a shorter delay (26 days) to obtain of maximum germination rate with a latent time equal to 8 days (Fig. 4B). To a lesser extent, the hot water pre-treatments at 60°C and 70°C enabled an increase of germination rate up to 8 ± 3.3% and 14 ± 6.9% although but with a longer latent delay of 22 and 18 days, respectively (Fig. 4). However, these treatments required about 50 days to obtain the maximum germination rate.

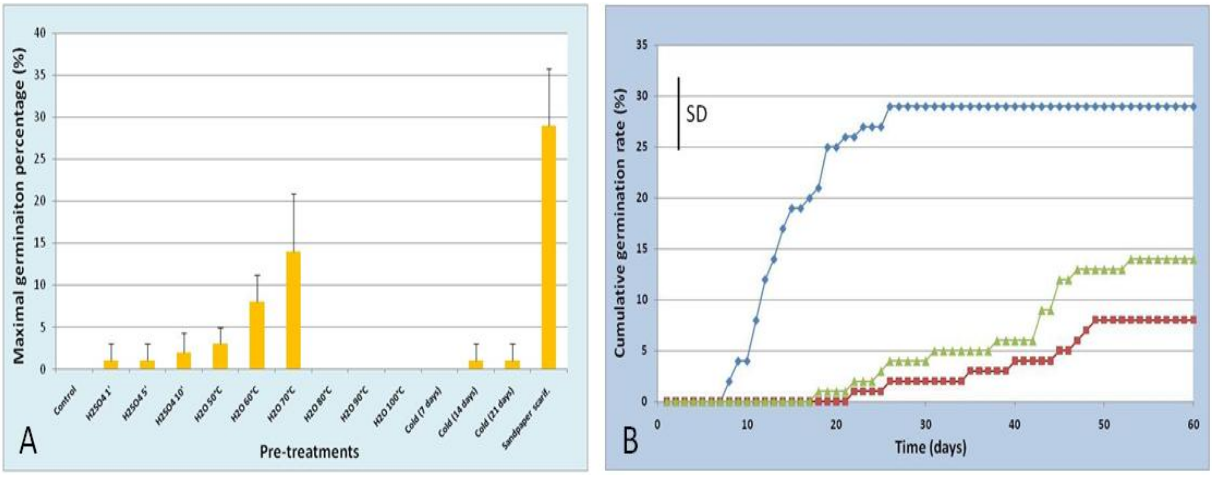


Fig. 4. Effects of different pre-treatments on the germination of *Gahnia aspera* seed. A: Effects of different pre-treaments on the germination percentage after 60 days (standard deviations are shown as error bars); B: Time course of germination after sandpaper scarification (υ), 70°C water bath (▲), 60°C water bath (■) . Means of 4 replicates. (scarif.: scarification)

Scanning electron microscopy observations of the micropylar zone before and after a hot water treatment at 70°C show a clear degradation of the pericarp (Fig 5). Indeed this treatment leads to dissociation between the structure filling the micropylar zone and the pericarp surroundings. It is also interesting to notice that the embryo is localised near the micropylar region (Figs. 2D, 5A).

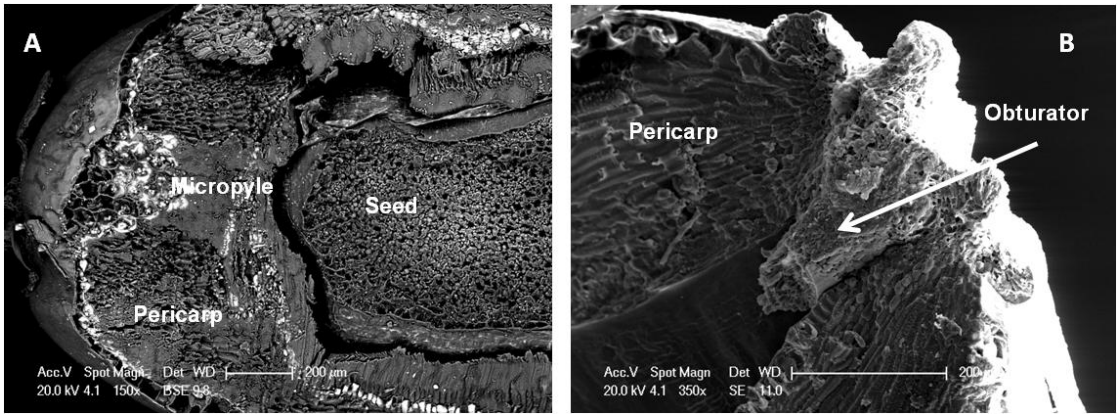


Fig. 5. Photographic illustrations of the effects of a hot water treatment at 70°C on *G. aspera*'s micropylar zone. A: Non treated-seed; B: treated seed.

3.5 Imbibition experiments

The average weight increases for non treated seeds (control) reach 17.31 ± 1.45%, after approximately four days (Fig. 6). In case of scarified seeds the increase only reach 11.58 ± 3.84%. The first 10% increase in weight of both the control and the treated seeds is obtained within 20 hours, subsequently, seed weight increases progressively to attain a maximum after 94 hours of imbibition.

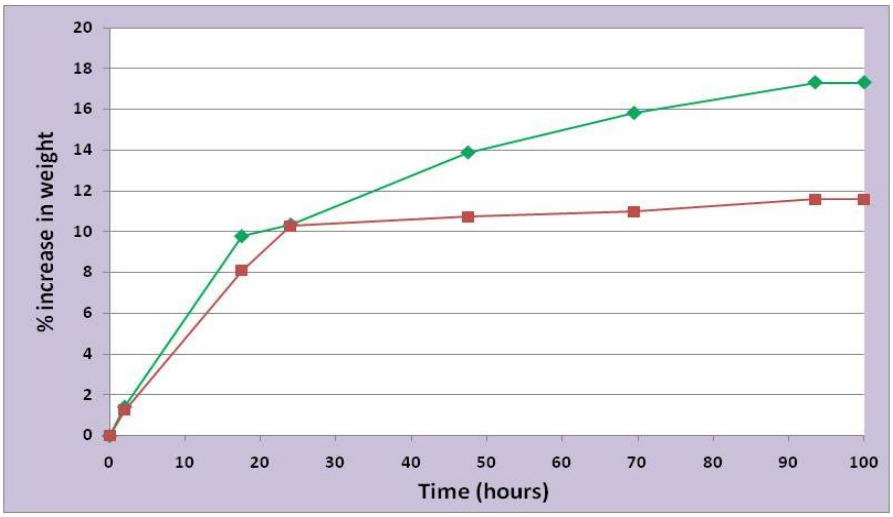


Fig. 6. Average percentage increases in weight of non treated seeds (♦) and sandpaper scarified seeds (■) of *Gahnia aspera*.

3.6 Biochemical content of seed storage reserve

The neutral lipid fraction appears to be the major seed storage reserve of *G. aspera* with 17.77 ± 1.10% of dry matter, followed by the total hydrosoluble protein fraction with 14.63 ± 1.90%. The hydrosoluble sugar and starch contents represent 3.59 ± 0.76 % and 8.92 ± 0.65%, respectively.

3.7 Seed storage experiments

After 2 months of storage (Fig. 7A), notable differences can be observed between all the treatments assayed (Fig. 7). For a relative humidity (rh) of 5%, better germination rate (33%) was obtained at 4°C whereas the maximum was only 20% and 21% at 15°C and at room temperature respectively. Whatever the considered temperature, latent time was 20 days with a relative humidity of 5%. For a 11-12% rh, the same tendencies can be notice although maximum germination rates are twice as less and, surprisingly, latent time is shorter between 11 and 15 days.

After 12 months of conservation, the germination behaviour tendencies are almost the same as for 2 month of conservation. Indeed, for a relative humidity of 5%, better germination rate (27%) was obtained at 4°C and germination rates reach 24% and 20% for room temperature and 15°C, respectively. For a 11-12% rh, each temperature germination curve profile displays more or less the same behaviour as for a 5% rh.

Considering the viability rate of each sample which has been submitted to conservation experiment, it can be notice that it decreases over time, whatever the considered storage conditions. It also appears that the sample lot placed at 4°C and at 5% rh presented the lowest reduction of this rate. At this relative humidity, the higher the conservation temperature, the lower is the viability rate. In contrast, for a relative humidity of 11-12%, , the viability rate drops by half from the second month’s storage

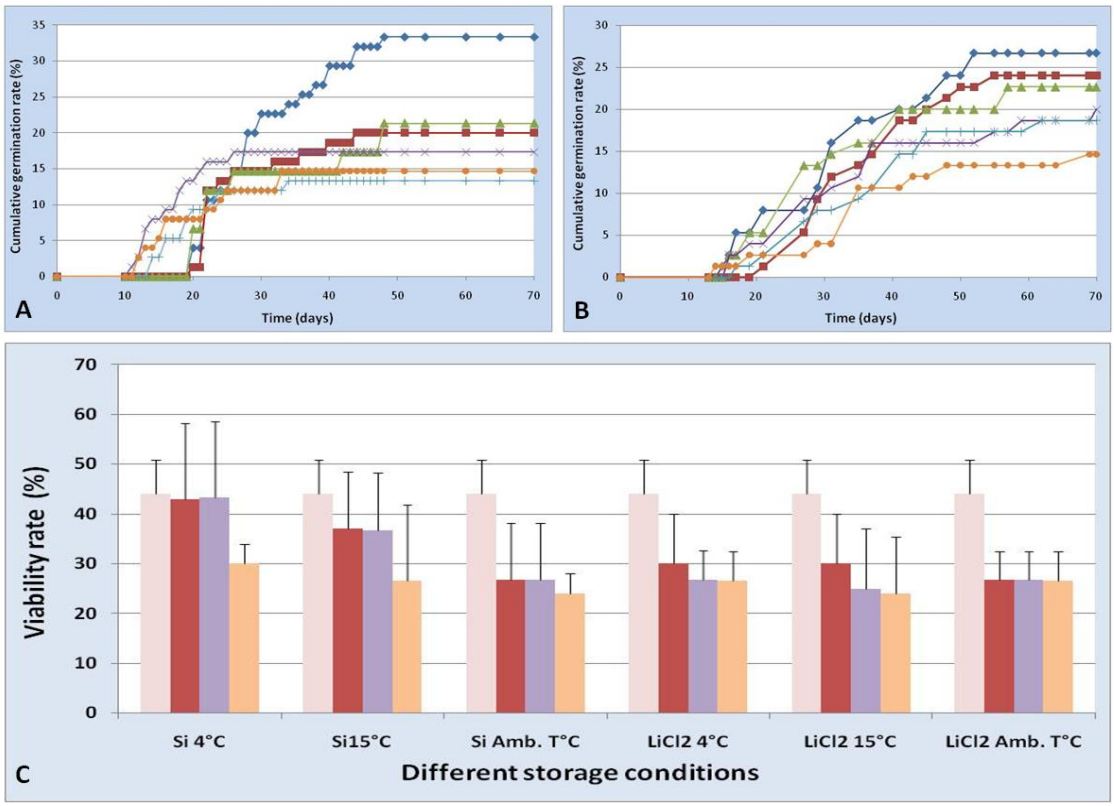


Fig. 7 Effects of different relative humidity associated to temperature during storage on germination and viability of *G. aspera* seed. A, B: Time course of germination at 25°C of seeds pretreated with a 70°C water bath after 2 months (A) and 12 months (B) of storage at 4°C/5%rh (υ),15°C/5%rh (■), room temperature/5%rh (▲),4°C/11-12%rh (×),15°C/11-12rh (●), room temperature/11-12%rh (+); C: Viability rate of seed lots after 0 (■), 4 (■), 6 (■) or 12 (■) months of storage at different temperature and humidity.

4. Discussion

4.1 Fruits and seeds characteristics

Gahnia aspera plants produce quite important amounts of fruits (achene). Compared to other Cyperaceae, *G. aspera* has one of the largest and the heaviest fruits (21 mg). For instance, *Fimbristylis miliacea* seeds only weighs 0.0012 mg (Leck and Schütz, 2005); *Isolepis inundates,* 0.07 mg; *Uncinia* uncinata, 0.42 mg; *Schoenus nigricans,* 0.45 mg (Bocchieri et al., 1987); *Baumea articulate*, 1.32 mg; *Gahnia pauciflora*, 15 mg and *Gahnia xanthocarpa,* 13 mg (Moles et al., 2000). However, some authors have weighed *Gahnia aspera* lots at 60 mg (Leck and Schütz, 2005). The difference may be due to a great number of underdeveloped or aborted seeds observed in our initial lot (44% viability) (data not shown). As for their length, Cyperaceae nuts are generally small, such as for *Cyperus inflexus* (1 mm) (Baskin and Baskin, 1971), *Schoenus nigricans* (1.75 mm) (Bocchieri et al., 1987), *Bolboschoenus fluviatilis* subsp. *Yagara* (3.5 mm), *Bolboschoenus fluviatilis* subsp. *fluviatilis*

(4.2 mm) (Browning et al., 1997), but they can reach 1.5 cm long for *Scirpodendron ghaeri*. *Gahnia aspera* achene's length is about 6 mm which is within the known range for Cyperaceae seeds. However it is similar to seeds of *Scleria* genus, which are considered as one of the largest Cyperaceae seeds (Leck and Schütz, 2005). It is well known that large seeds have more metabolic reserves to compensate for a lack of resources in the environment (Leishman et al. 2000; Black et al., 2006), which is indeed the case in ultramafic soils of New Caledonia. Higher reserves may provide a mechanism for seedlings to survive in an environment that lacks resources. Moreover, the abundant fruit production by *G. aspera* is likely to increase the chances for *G. aspera* regeneration.

Observations of internal structure show a thick woody pericarp (Figs. 2D, 3A, 5A). As for other Cyperaceae, pericarp and testa are free from each other (Browning, 1997). The pericarp makes up for one half of the fruit size whereas, the other half is occupied by the seed situated near the fruit's micropyle. The embryo contained in this endospermate seed shows an orientation of its radicle in direction of the fruit's micropyle. Embryo to seed ratio value (0.3) is within the range values reported for Cyperaceae species (Forbis et al., 2002; Finch-savage and Leubner-Metzger, 2006) though it is in the top values. According to Martin's classification, *G. aspera*'s seed embryo could be defined as peripheral and capitates, according to Black et al. (2006) and basal and capitates, according to Finch-Savage and Leubner-Metzger (2006). However, whatever considered authors G. aspera has a capitate type of Cyperaceae embryo (Baskin and Baskin,1998; Black et al., 2006; Finch-savage and Leubner-Metzger, 2006).

The SEM photograph of longitudinal section shows a thin cuticle and a layer of epicarp cells with deposits of silica in its inner part. Specialized finger like ingrowths structure embedded with silica involve along the inner wall cell and converge towards the centre of the cell (Fig. 3C, 3D). These anatomical traits which have already been found in Cyperaceae species confers undoubtedly greater hardness and resilience of epicarp (Padhye, 1971 ; Browning et al., 1997).

Moreover, such as for some Cyperaceae species, we can also observe in the outer part of the endocarp, the presence of structures embedded with silica (Figs. 3E, 3F) oriented transversally (Browning et al., 1997) which confers extra hardness. This latter seems to be vessels occluded with silicon-rich substance. The structures look like coir, a ligno-cellulosic fibre occurring in the thick fibrous mesocarp of the coconut palm fruit, well known for its greater resilience and its slower decomposition compared to other natural fibres (Black et al., 2006). Moreover,

plant fibres are known to be sensitive to moisture absorption. Thus, waterproof quality is uncertain (Black et al., 2006).

SEM photographs of the micropylar zone (Figs. 3A, Fig. 5A) also show a different structure organization of cells, which may represent a potential water passage. Such a structure is well known in Cyperaceae species, as in *Kyllinga brevifolia*, for which this so called obturator is formed of a group of superficial basic funiculus cells which elongate and cover the micropyle (Padhye, 1971).

Imbibition experiments enabled us to suggest the role of this structure as water uptake of non treated seeds, compared to sandpaper scarified seeds, confirms our structural and ultrastructural observations. Indeed, during the first 20 hours of imbibition, the weight increases seem to evolve similarly (same slope) for both scarified and non scarified seeds. Then, the scarified seed's weight reaches a plateau whereas the control rises quite slowly. This difference may be due to the removal of the pericarp. Indeed, time required to reach the plateau coincided with phase 1 of germination i.e. seed imbition phase (Black et al, 2006; Côme, 1982). Then the observed plateau corresponds to the beginning of the phase 2 prior to germination *stricto sensu* which occurs after 8 days. In the control case increase in weight, observed after 20h, is probably due to the imbibition of the fruit parts which have been removed on the scarified seeds. The water permeability results are in accordance with data reported on *Carex* species (Schütz, 2000).

4.2 Viable seed selection by floating and germination requirements

Gahnia aspera seed initial sample viability was evaluated at 44 ± 5.56%. Floatability tests show efficient results as 42% of the non viable seed were removed. Final sample resulting from this separation is then characterized by a viability rate of 76%. Non viable *G. aspera* seeds are important and represent almost half of the sample. These latter are either aborted or not fully developed (personal observation). Schütz (2000) reported that the production of viable seeds is normally abundant in cespitose sedges, but is relatively low in clonally spreading species. Indeed, in natural environment, *G. aspera* are mainly concentrated by patches of herbs (personal *in situ* observation). Poor seed quality of sedges have also been related to the important rate of seed abortion by Leck and Schütz (2005) and this trait was attributed to limited soil resources and to genetic predisposition of species to use resources uppermost for structural components than for seed production.

Numerous studies have been carried out on sedge seeds of temperate regions and in particular on *Carex* species, since it is the most important genus of Cyperaceae and it is broadly

distributed in these regions. Subject studies focused mainly on sedge seeds ecological behaviour (dormancy, germination, persistence..). Unfortunately, there is a weakness of data on tropics sedge seeds compared to temperate ones especially considering structure and germination behaviours of *Gahnia* species. Nevertheless, as reported by some authors, Cyperaceae species are known to develop either 'physiological' dormancy caused by a physiological mechanism of the embryo which inhibits radicle emergence (Baskin and Baskin, 1998), or no dormancy (Black et al, 2006; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Leck and Schütz, 2005; Bocchieri et al., 1987; Baskin and Baskin, 1971; Schütz, 2000; Amen and Bonde, 1964). Mean weight of *G. aspera* (21 mg) may indicate an important dormancy according to Schütz (2000). Indeed, considering *Carex* species, a genus of sedge family, dormancy is more important in large seeds as they display thicker and harder seed coats (Schütz, 2000). *Carex* nuts mean weight is about 0.79 mg and ranges from 0.29 mg to 1.88 mg. Some authors reported that thicker (hard) pericarp of large seeds are an adaptation for avian internal transport which could induce a natural scarification. Indeed, *G. aspera* is particular because of its scarlet-coloured seeds which are most probably very attractive to birds (Leck and Schütz, 2005).

Moreover, as noted by Leck and Schütz (2005), structures covering the embryo may play a role. We also believe seed coat thickness is probably significant and deserves further study. This trait appears to be a part of our problematic, as sandpaper scarification improves the maximal germination rate. To lesser extent, hot water treatment at 60°C and 70°C increase the germination rate but the sandpaper scarification is more efficient as it enables germination as soon as 9 days after sowing. Imbibition experiments showed that *G. aspera*'s achenes are not water impermeable. This observation allows to establish at the moment that *G.apera*'s dormancy type could be identified as a non deep physiological dormancy (Baskin and Baskin, 1998). According to our results, *G. aspera*'s dormancy is a coat-imposed dormancy (Black et al. 2006), the cause of this latter is unknown at the moment, but it can be multiple (mechanical constraints, presence of chemical inhibitor, deprivation of oxygen supply...). Indeed, the nature of the seed coat and size of seeds are known to influence germination markedly (Baskin and Baskin, 1998; Schütz, 2000).

However, positive germination results from hot water treatment at 70°C (14%) and subsequent SEM observations indicate the obturator is damaged. It is deconstructed and it seems to be weakened by the heat. Thus the radicle probably emerges by overcoming the resistance of the micropylar region and especially the obturator. According to such results, we suggest mechanical constraints are responsible for the coat-imposed dormancy of *G. aspera* seeds.

None of the dormancy-breaking treatments were able to completely alleviate dormancy in the seed lot i.e. seed germination did not reach the 44% potential indicated by the tetrazolium viability test, suggesting there may be another dormancy mechanism present in *G. aspera* seed, necessitating further studies.

4.3 Seed conservation in relation to orthodoxy and chemical composition

This is the first biochemical study on *G. aspera*'s seed storage reserve and according to our results seeds can be considered as oily as neutral lipids represent the major storage reserve (17.77 ± 1.10%). The lipid quantity is within the range reported for other Cyperaceae species: *Gahnia tristis* (20%); *Gahnia pauciflora* (11.7%); *Cyperus ustulatus* (18.4%); *Uncinia affinis* (14.4%); *Carex carsei* (8.5%) (SOFA, 2009). Total protein fraction appears to be the second major reserve with 14.63 ± 1.90% and is within the range reported for 19 Cyperaceae species estimated between 5 and 25% (Barclay et Earle, 1974). Starch and hydrosoluble sugars are the last storage reserve with 8.92 ± 0.65% and 3.59 ± 0.76% respectively. It is well known that biochemical composition is important in terms of conservation and in terms of energy supply for the establishment of seedlings. Leck and Schütz (2005) reported that transformation of lipid storage materials to starch is important for the elimination of dormancy of *Carex flava* group.

The ability to store seeds is critical for their use in revegetation plans. The low (< 10%) seed moisture content (7.29 ± 1.18%) suggests that *G. aspera* seed is able to tolerate desiccation, that its storage behaviour is orthodox (Côme and Corbineau, 2006) and that long term conservation at low temperature is possible. Moreover, seed storage reserves, particularly the presence of lipid reserves, can affect seed storage requirements. High lipid containing seeds require storage at lower moisture for optimum storage (Vertucci and Roos, 1990). The presence of lipid reserves in *G. aspera* suggests that a low storage moisture may be required to maximise storage life.

Results obtained during storage assays seem to confirm that the best way to store *G. aspera* seeds is at low temperature, i.e. 4°C, and also at low relative humidity, i.e. 5%. Unlike temperate sedges, tropics sedges viability may decline quickly. Indeed, Leck and Schütz (2005) reported that viability of western Australian sedges declined rapidly (2-12 months after collection) during storage both in the laboratory conditions and in the field, and most species had zero germinability after 32-34 months. Thus, our results show interesting patterns of conservation since *G.aspera*'s achenes show quite a high proportion of viability rate after 12 months whatever the conditions including at room temperature. Moreover, the germination

behaviour of each conservation treatment displays the same tendencies either after 2 or 12 months.

Recommendations

According to literature and to our results, sedge species are important herbaceous components of "maquis minier" vegetation. *G. aspera* in particular is one of the first commonly re-growing species in natural environment and thus appears to be an important potential herbaceous pioneer plant for revegetation of degraded mining sites in New Caledonia. However, up until today, its use in restoration plans has not succeeded satisfying. Schütz (2000) noted there is a low correlation between laboratory germination tests and field germination of sedges. In arid Western Australia, low germinability and low viability of sedges such as in New Caledonia also limits the value of direct seeding for restoration. Moreover, generally in New Caledonia's "maquis minier", the top soil layer is very thin and contains a poor seed bank. In regards to all these facts, the safer way to establish sedge appears to be the removal of topsoil removal during the scrapping phase of exploitation and its direct use for revegetation (Schütz, 2000). Sowing seeds on topsoil is the useful to increase chances of establishment. One of the processes which may respond to many aspect evoked in this study, is hydroseeding. Our results could lead to some improvements in hydroseeding of *G. aspera* seeds.

Optimisation may be achieved by several approaches:

1- by providing good quality seeds i.e. with a high viability level. Selection by floating appears to be a good alternative to amplify the ratio of viable/non viable seeds for *G. aspera*.

2- by providing seeds which able to germinate as quick as possible and show a high germination rate in order to maximise the establishment of plantlets. Considering our results, scarification method seems to be the best way to obtain such a result (latent time: 9 days; maximum germination percentage after selection by floating: 50.1%). Nonetheless, for application to large-scale revegetation, the hot water bath method provides simple and low cost method for alleviating dormancy in 20-25% of the seed population after selection by floating. This will allow immediate emergence of some *G. aspera* from the seed population while leaving some seed in the soil seed bank for subsequent emergence.

Further investigations will be dedicated to estimate if priming methods can still improve seed germination. Once germination has been optimised, plantlets' growth will be studied and effects of mycorhization will be investigated.

II.2/ Résultats de l'étude détaillée concernant les semences d'une espèce de Rhamnaceae pionnière : Alphitonia neocaledonica (Schltr.) Guillaumin

II.2.1/ Etat de l'art

Alphitonia neocaledonica (Schltr.) Guillaumin est une espèce endémique de la Nouvelle-Calédonie. Elle est reconnue depuis des années comme étant une bonne espèce pionnière des sols des terrains miniers (CTFT, 1978; Jaffré et Pelletier, 1992). De part cet état de fait, et la répartition importante de cette espèce le long de "Grande Terre", les semences de cette dernière ont toujours été intégrées dans les différents essais de revégétalisation. Cependant, les semences d'*Alphitonia neocaledonica* présentent une dormance importante qui réduit fortement les chances de réimplantation de cette espèce et le succès des différentes campagnes de revégétalisation. Malgré tout, quelques études spontanées ont pu traiter en partie les phénomènes de dormance et de germination des semences d'*Alphitonia neocaledonica* avec plus ou moins de résultats (Jaffré et Rigault, 1989 ; Jaffré et Pelletier, 1992 ; Jaffré et al., 1993). Néanmoins, aucune étude complète n'a encore été menée concernant la structure des semences, la levée de dormance et la germination de ces dernières. Ainsi, les objectifs de cette étude ont été de caractériser la structure et la composition des semences d'*Alphitonia neocaledonica*, de définir le profil de sa germination et ceci dans le but d'apporter un éclairage supplémentaire concernant ces différents traits de vie et ainsi « booster » le succès des opérations de revégétalisation.

II.2.2/ Publication concernant les semences d'*Alphitonia neocaledonica*

Cette publication intitulée « Structure and biology of *Alphitonia neocaledonica* seeds used for ultramafic soil revegetation in New Caledonia » a été soumise au journal « Forest Ecology and Managment » à la date du 10 mai 2010. Comme pour l'article concernant l'espèce *Gahnia aspera*, pour des raisons de lisibilité, seules les parties résultats et

discussions seront présentés, et les références bibliographiques ont été intégrés dans la bibliographie finale.

Extrait de la publication :

3. Results

3.1 Phenology and geographical distribution

Analysis of herbarium vouchers at the IRD Centre in Noumea showed *A. neocaledonica* flowers from December to May with fruit formation from May to September. Fruit matures from September to March. The main seed collection time is between December and February when fruit supply is greatest. *A. neocaledonica* is found from sea level up to an altitude of 1000 m and is distributed throughout the main island.

Figure 1 shows the geographical distribution of *A. neocaledonica* along the "Grande Terre". There were no samples from the Loyalty Islands. The herbarium samples show that *A. neocaledonica* is mainly confined to ultramafic soils.

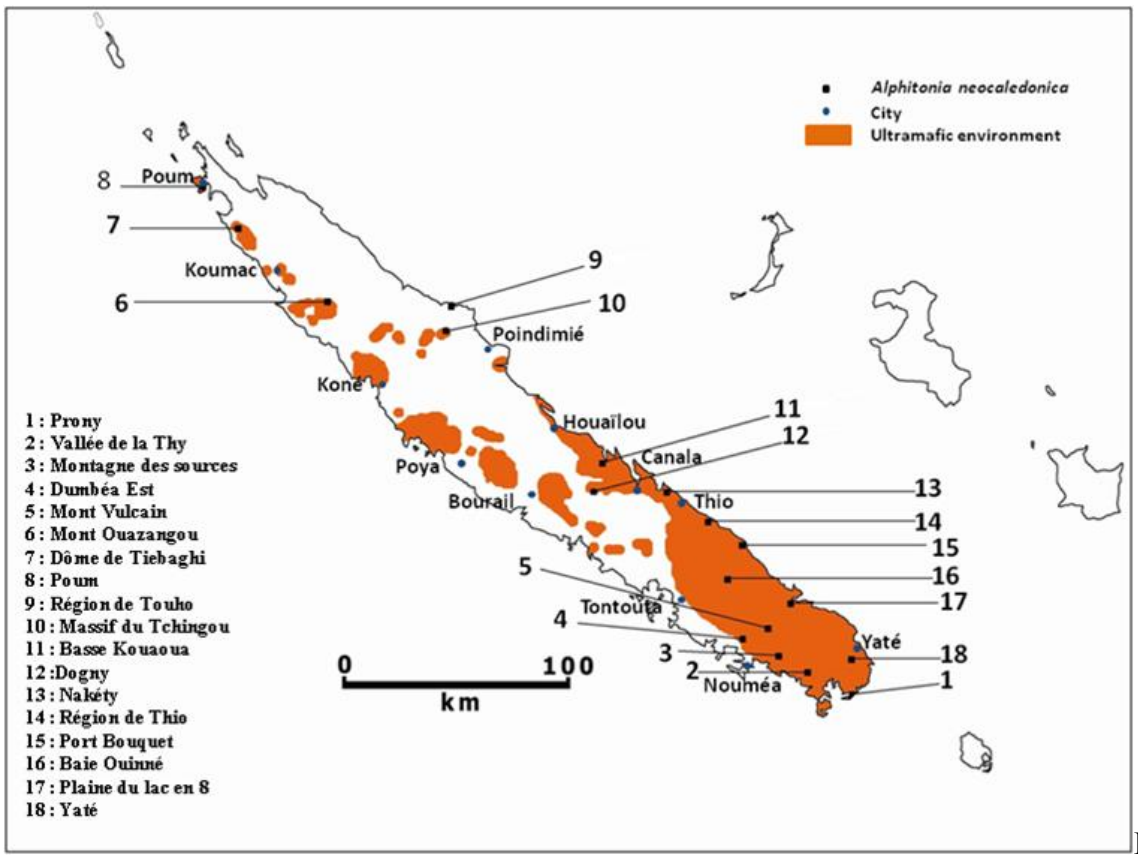


Fig. 1. Geographical distribution of *Alphitonia neocaledonica* on the main island of New Caledonia in relation to the position of ultramafic soils. Data is based on herbarium vouchers deposited at the IRD Noumea.

Table 1
Mean precipitation, temperature and relative humidity for the 2005-2009 at Yate region (point 18 on fig. 1) calculated from raw data provided by METEO-FRANCE.

Month	Mean precipitation (mm)	Mean temperature (°C)	Mean relative humidity (%)
January	345.7	26.0	80.9
February	327.4	26.3	81.9
March	496.9	25.6	83.8
April	494.1	24.4	83.1
May	218.9	22.0	78.8
June	169.2	20.7	77.5
July	150.7	20.1	76.6
August	140.4	19.9	76.3
September	208.2	21.3	76.5
October	138.3	22.2	74.2
November	181.2	23.7	78.4
December	152.2	25.00	76.4

3.2 Fruit and seed morphology

The inflorescence of *A. neocaledonica* is a panicle from which develops numerous hard, round and green 11-23 mm long drupes. These drupes turn black at maturity. The pericarp then dries and falls away, exposing two ovate black seeds covered by a red aril, each enclosed in a hard pyrene (Fig. 2).

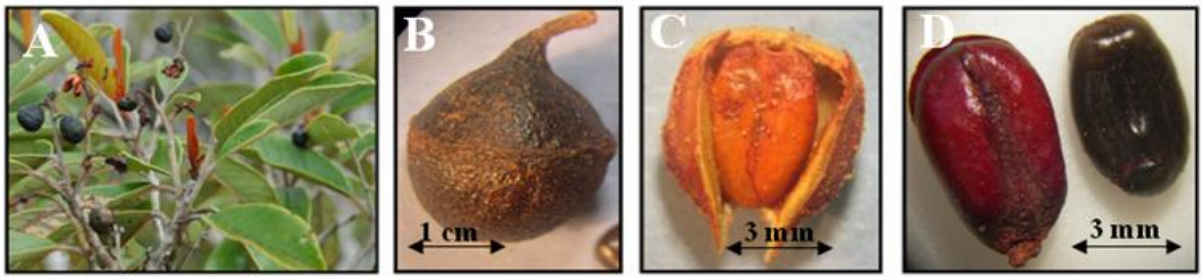


Fig. 2. Photographic illustrations of the *Alphitonia neocaledonica* plant, fruits and seeds. A: an adult plant with mature fruits; B: fruit; C: a seed with its aril enclosed in a hard pyrene; D: a seed with and without its red aril.

The mature seeds were approximately 4.28 ± 0.11 mm long, 2.95 ± 0.02 mm wide and 1.99 ± 0.01 mm high. The fresh weight of 100 seeds was 2.24 ± 0.06 g. The moisture content of fresh seeds was 8.89 ± 0.2% (Table 2). The seed coat is lustrous, smooth and impermeable (Fig. 3).

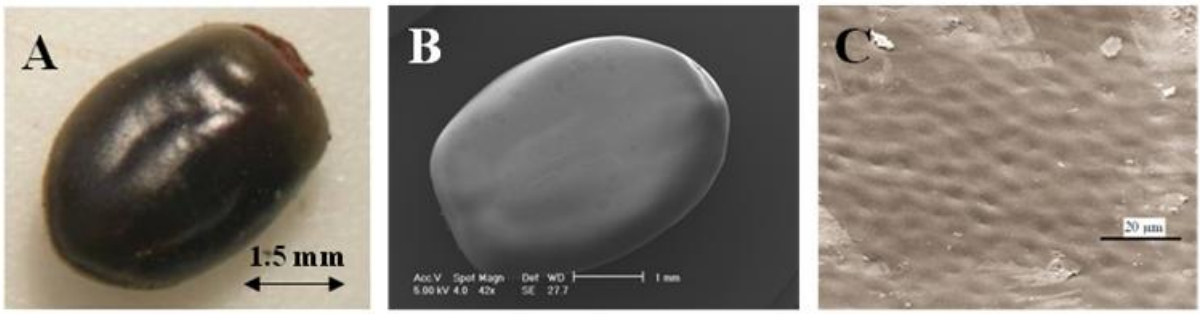


Fig. 3. Photographic illustrations of the *A. neocaledonica*'s seed integuments surface with a binocular (A) with a SEM (B, C); C: zoom of the integument surface.

Table 2
Alphitonia neocaledonica seed characteristics. (E.S ratio: embryo to seed length ratio; SD: standard deviation)

Average weight for 100 seeds (g ± SD)	Average seed length (mm ± SD)	Average seed width (mm ± SD)	Average seed height (mm ± SD)	E.S ratio	Viability (% ± SD)	Moisture content (% ± SD)
2.24 ± 0.06	4.28 ± 0.11	2.95 ± 0.02	1.99 ± 0.01	0.8	76 ± 6	8.89 ± 0.20

3.3 Seed internal structure

Transverse sections of the *A. neocaledonica* seed show an important and thick integument that is likely to play a role in the inhibition of germination (Fig. 4A, B). A thin cuticle is present on the seed coat surface. Below, this is a prominent light line of *linea lucida* which is intercalated between the cuticle and a lignified longitudinal organized structure that seems to be palisade-like Malpighian cells. The hard integument (0.3 mm) is comprised of these lignified longitudinal cells (Fig. 4D). The seed is endospermic (Fig. 4C, D). Mature seed have a fully developed, opaque, large, spatulate type embryo (Fig. 5). The embryo to seed length ratio (E.S ratio) is estimated at 0.8 (Table 2).

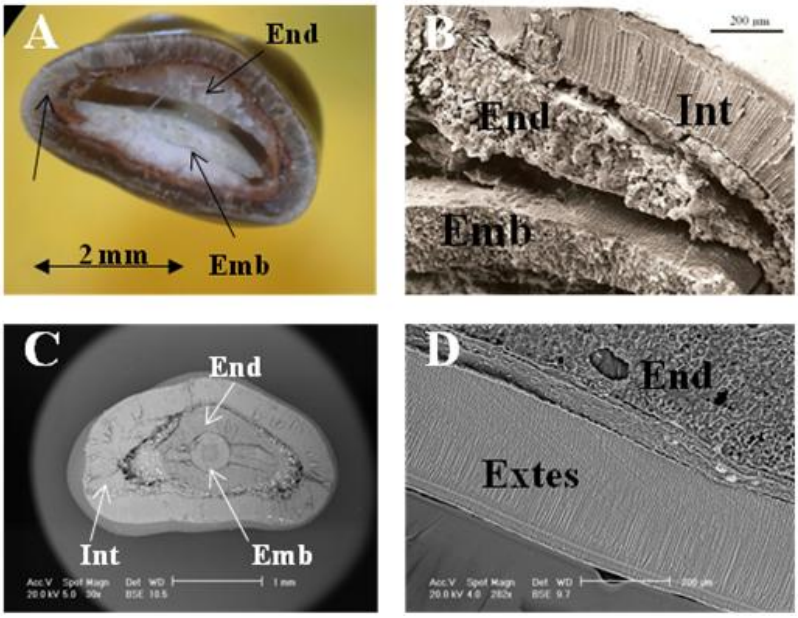


Fig. 4. Photographic sections of *Alphitonia neocaledonica* seed. A, B: Transverse section observed with a binocular (A) or with a scanning electron microscope (B); C, D: Longitudinal section observed with a scanning electron microscope. (Int: Integument; End: Endosperm; Emb: Embryo; Extes: Exotesta)

3.4 Imbibitions experiments, seed viability and germination requirements

3.4.1 Imbibition

In control (non-treated) seed the increase in weight is limited to 6.92 ± 2.37% after 72 hours (Fig 5A). In contrast, seed weight reached 18.64 ± 5.40% and 31.17 ± 3.14% for seeds exposed to an 80°C water bath followed by 12h cooling and to an 80°C water bath for 5 min, respectively. This is three and five more than the control increase.

3.4.2 Viability

The viability of the *A. neocaledonica* seed lot was relatively high at 76 ± 6% (Table 2; Fig. 5B, C). Figure 5B shows viable *A. neocaledonica* seed with both the radical and more than half of the cotyledon surface slightly or intensively coloured. In contrast, a non viable seed shows no staining to any parts of the seed tissue (Fig. 5C).

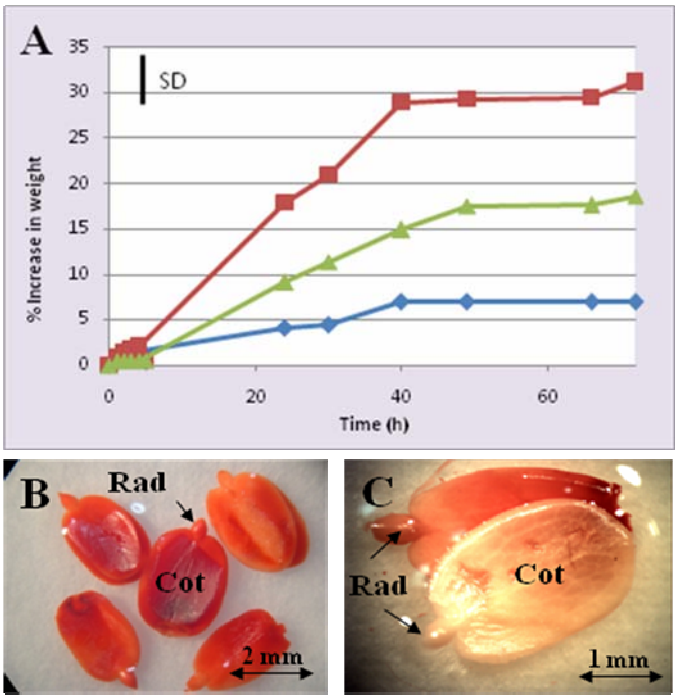


Fig. 5. Imbibition and seed viability experiments. A: Average percentage increases in weight of non treated seeds (♦) and 80°C water bath for 5 min (■) or 80°C water bath followed by a cooling for 12h (▲) treated seeds of *Alphitonia neocaledonica* after up to 72h imbibitions (Means of 3 replicates. vertical bar denotes the largest SD); B, C: Tetrazolium test results showing viable embryos (B) and a viable compared to a non viable embryo (C). (Cot: Cotyledon. Rad: Radicle)

3.4.3 Germination requirements – dormancy-break

Germination of untreated control seed at 25°C gave a low germination percentage of only 2% after 45 days (Fig. 6). *A. neocaledonica*'s seeds are light-indifferent (data not shown).

In contrast scarifying the seed with sandpaper resulted in 60% percent germination and scarification with a scalpel 51%. Both the germination percentages are significantly higher than that of the control (Fig. 6C) but are not significantly different from each other. A series of humid pre-treatments i.e. hot smoke water at 70°C (35%) to 100°C (31%) and hot water at 80°C (34%) and 90°C(31%) also enhanced germination of *A. neocaledonica* (Fig. 6A, B).

In the hot water treatments (Fig. 6A), there was no significant difference in the germination percentage of seed immersed in water at temperatures from 25°C to 70°C and at 100°C compared with control seed. The 100°C humid pre-treatment allowed the seed to rehydrate, but also killed the seed, hence there was no significant increase in germination above that of control. Germination was only found to be significantly higher at water bath temperatures of 80°C and 90°C. For the hot smoke water bath treatments (Fig. 6B),

germination did not increase significantly compared with control germination until the temperature reached 70°C from where it significantly higher than that of control at all water bath temperatures up to 100°C. Moreover, a statistical analysis (data not shown) revealed that at 70°C and 100°C, a smoke water bath significantly enhanced the germination compared with a hot water treatment at same temperatures.

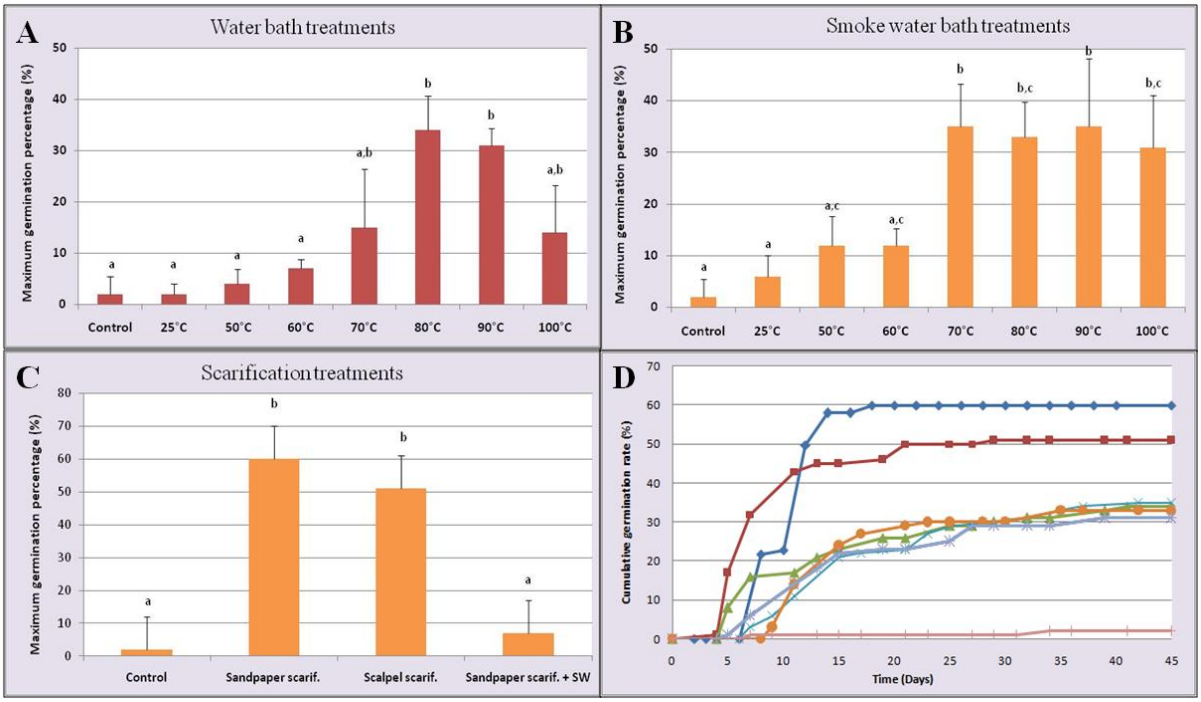


Fig. 6. Effects of different pre-treatments on the germination of *Alphitonia neocaledonica* seed. A: Effects of water bath treatments at different temperatures versus control; B: Effects of smoke water bath treatments at different temperatures versus control; C: Effects of scarification treatments at different temperatures versus control; D: Time course of germination after sandpaper scarification (υ), scalpel scarification (■), 80°C water bath (▲), 90°C water bath (*), 70°C smoke water bath (×) and 80°C smoke water bath (●) versus control (+). Different letters denote significant differences within treatments ($P<0.05$). Means of 4 replicates. Standard deviations are shown as error bars. (scarif.: scarification. SW: smoke water)

A comparison of scanning electron microscopy images of the seed coat of control seed with seed immersed in water at 80°C hot water showed fissures in the seed coat close to the hilum region (Fig. 7).

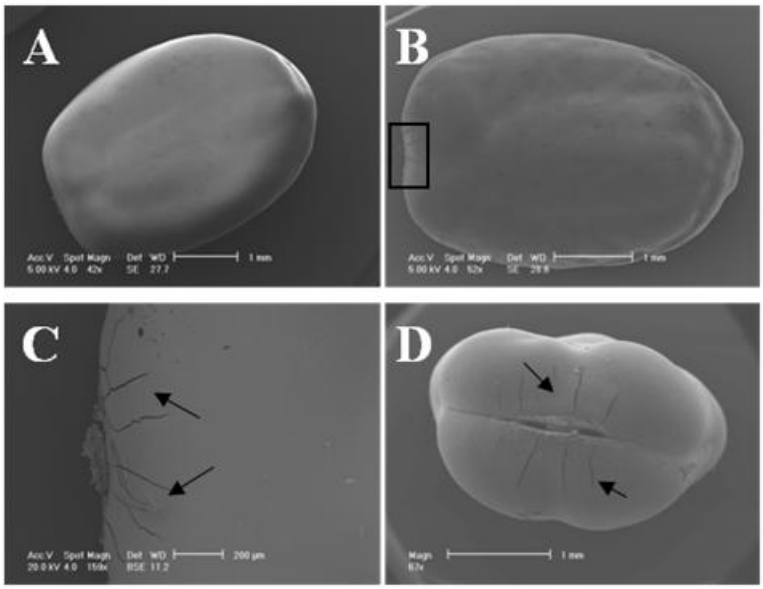


Fig. 7. Scanning electron microscopy images showing the presence of fissures post-immersion in an 80°C water bath on the seed coat near the hilum region of *Alphitonia neocaledonica* seeds. Control seed (A); treated seed (B); hilum region in detail (C); hilum region full-frontal view (D). (Arrows indicate cracks)

Considering the cumulative germination rate (Fig. 6D), the best pre-treatment appears to be sandpaper scarification as it led to the shorter duration (18 days) to obtain the maximum germination rate (60%) with a latent time of 6 days. A latent time of 5 days was obtained both with the hot water bath at 80°C and sandpaper scarification. In contrast, the length of germination is about 29 days and 41 days for scalpel scarification and the 80°C hot water bath treatment respectively. The most effective hot smoke water treatments appear to be at 70°C, 80°C and 90°C (Fig 6D).

Sulphuric acid, liquid nitrogen and microwave treatments were not presented in figure 6 as none of these treatments improved germination, nor was there any increase in seed volume for the sulphuric acid or liquid nitrogen-treated seeds. However, microwave-treated seeds did show an increase in volume that seemed to indicate imbibition had occurred but the microwave treatment seems to destroy the embryo. The combined sandpaper scarification following by sowing on a layer of cotton wool wetted with smoke water treatment did not significantly increase germination (7%) as shown on Figure 6C.

3.4.4 Germination requirements – optimum temperature

Germination in *A. neocaledonica* seeds, which had been scarified with a scalpel, was quickest at 30°C taking only 4 days before germination was observed. However maximum germination (60%) was observed at 25°C compared with only 28% germination at 30°C. Germination was slower at 25°C with 7 days required before germination was observed. Germination at 35°C was only 4% (Fig. 8).

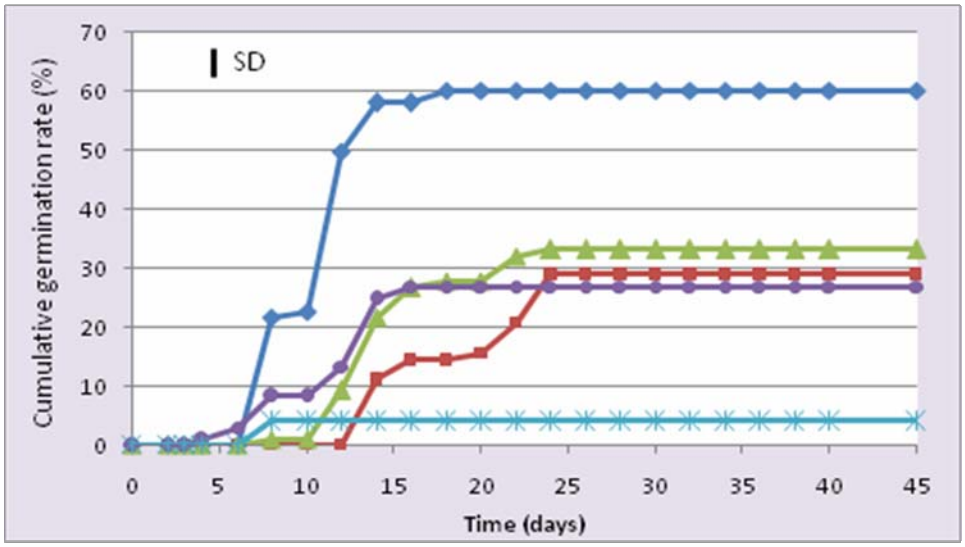


Fig. 8. Effects of temperature on the germination of *Alphitonia neocaledonica*. Time course of germination at 15°C (■), 20°C (▲), 25°C (υ), 30°C (●), 35°C (×). Means of 4 replicates. Vertical bar denotes the largest SD.

3.5 Biochemical content

Protein is the major seed storage reserve of *A. neocaledonica* comprising 14.67 ± 1.12% of the dry matter. The neutral lipid fraction is about 11.76 ± 1.44% and the hydrosoluble sugar and starch contents represent only 1.36 ± 0.18% and 0.14 ± 0.05% respectively.

The results of the biochemical analyses were confirmed by transmission electron microscopy. Sections through the embryo of *A. neocaledonica* showed a large quantity of protein bodies and associated lipids bodies (Fig. 9A, B). Within these protein bodies are inclusions with the properties normally attributed to phytin. The lipid and protein bodies occupy the majority of the cellular space with relatively little other cytoplasm present. A starch grain can be found in some cells (Fig. 9B).

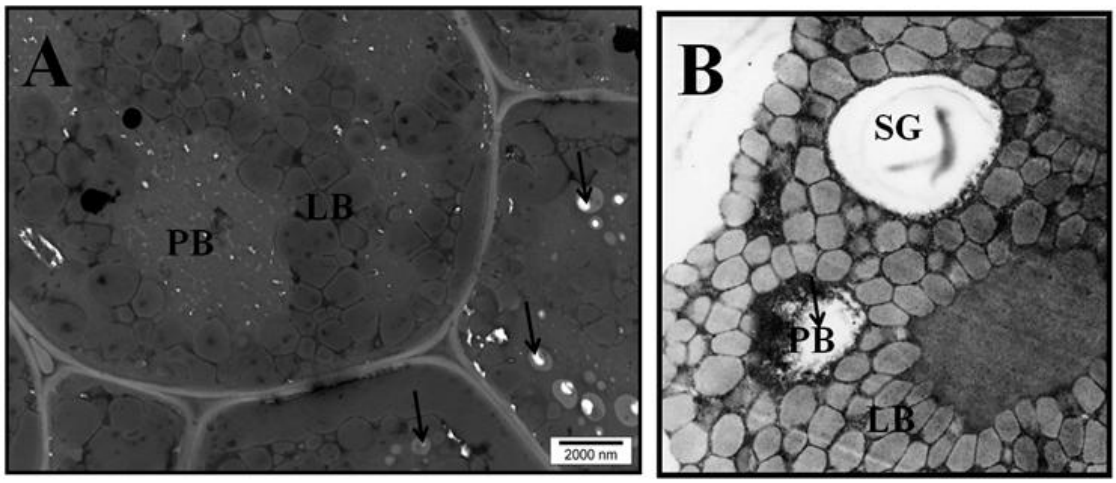


Fig. 9. Transverse sections through an *Alphitonia neocaledonica* embryo showing the cells heavily packed with protein bodies (PB) and lipid bodies (LB). Many of the protein bodies contain one or more inclusions (↓). Starch grain (SG) are also observed.

4. Discussion

4.1 Seed production and morphology

A. neocaledonica produces an abundant quantity of fruits. Seeds of *A. neocaledonica* are heavy and large compared to both other *Alphitonia* species and Rhamnaceae (Turner et al., 2005). Indeed, *Spyridium globulosum*, *Cryptandra arbutiflora* and *Pomaderris paniculosa* seeds weigh about 1.3 mg, 0.4 mg and 0.7 mg respectively and measure in length about 1.5 mm, 1.2 mm and 1.5 mm respectively. *Alphitonia incana*'s seed length is about 3.9 mm and weight about 18.4 mg (Turner et al., 2005). Seed of *Alphitonia excelsa* at 13mg (Smith et al., 2008) is similar to *Alphitonia incana*. Seed of both these species of *Alphitonia* are lighter and, for *Alphitonia excelsa*, smaller than *A. neocaledonica* seeds. Large seeds have more metabolic reserves to compensate for a lack of resources in the environment (Black et al., 2006) such as in ultramafic soils in New Caledonia. Higher reserves may provide a mechanism for seedlings to survive in an environment that is lacking in resources. Higher reserves may also give an advantage in the interspecific competition for survival. Moreover, the abundant fruit production by *A. neocaledonica* is likely to increase the chance of *A. neocaledonica* regeneration.

A. neocaledonica seeds have a thick lignified seed coat which is both hard and impermeable to water. The seed coat imposes dormancy on the seed by preventing water uptake. A similar seed coat structure to that observed in *A. neocaledonica* is found in other Rhamnaceae, for

example, *Discaria toumatou* (Keogh and Bannister, 1994). The presence of the Malpighian cells in the outer integument, and in particular in the exotesta places *A. neocaledonica* in the exotestal category using the seed coat terminology defined by Corner (1976). This is consistent with other Rhamnaceae species which have already been assigned to this class (Black et al., 2006).

Generally, mechanical protection of drupe seeds is provided by the fruit wall (pericarp) or its inner part (endocarp) and the integument produces a seed coat without physical tissue differentiation (Black et al., 2006). In the case of *A. neocaledonica*, two ovate seeds are enclosed in two hard pyrenes which already give mechanical protection. However, the seed coat is, as already described, thick and hard. This may be an adaptation to the extreme conditions (elevated temperature, leached soil, and possible predation) of the environment. Moreover, seed coat impermeability (physical dormancy) in a number species increases as seed moisture content decreases during maturation drying (Black et al., 2006). Seed moisture content is tightly correlated with the environmental humidity. The major part of the maturation drying of *A. neocaledonica* seed (September to December) coincides with a period where relative humidity and precipitation are lowest (Table 1).

A. neocaledonica seed is endospermic but the endosperm has been reduced through digestion by the embryo during seed development. The embryo to seed ratio is high (0.8) compared with that for *Alphitonia incana* (Turner et al., 2005), but, remains within values reported for other Rhamnaceae species (Forbis et al., 2002). *A. neocaledonica*'s seed embryo is a FA1 seed type, foliate and spatulate (Baskin and Baskin, 2004; Black et al., 2006; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

4.2 Imbibition experiments

Water uptake of control seed was negligible and confirms the results of structural observations that showed the presence of water impermeable tissues. There appear to be differences in tissue permeability between species within the *Alphitonia* genus. Seed of *Alphitonia incana*'s is also dormant but when control seed is placed on moistened germination paper, seed weight increases by 16%, (Turner et al., 2005) more than twice that of *A. neocaledonica* seed.

Moreover, weight of *A. neocaledonica* seeds exposed to an 80°C water bath followed by 12h cooling and expose to an 80°C water bath for 5 min, is five and three times greater than

the control increase, respectively. These significant differences reveal the positive effects of treatments that increase seed coat permeability on seed imbibition.

In non-dormant *A. incana*'s seed i.e. scarified seeds, water uptake was observed within one hour of the start of imbibition (Turner at al., 2005) compared with *A. neocaledonica* where after 1 hour little water uptake was observed. Slow water uptake rates have been suggested to be an adaptation to brief, intermittent and sporadic rainfall (Thanos et al., 1989; Baskin and Baskin, 1988). This kind of mechanism would be useful for deferring germination until sufficient soil moisture is available to ensure seedling survival (Baskin et al., 2000; Baskin and Baskin, 2004). Such an adaptive mechanism would be an advantage for *A. neocaledonica* which grows in an environment where summers are hot and rainfalls often sporadic. *Spyridium globulosum*, also grows in an environment with the same characteristics as those of *A. neocaledonica*, i.e. highly leached soils, high summer temperatures, poor topsoil and nutrients (Turner et al., 2005). A comparison of hot water-treated *A. neocaledonica* seed (80°C, 5 min.) after 72h imbibition with other similarly treated Rhamnaceae (Turner et al., 2005), showed that *S. globulosum* had a similar weight increase as *A neocaledonica* (about 20%) but this weight increase was lower than that of other Rhamnaceae species where a more than 40% weight increase was observed. This suggests both these species (*A. neocaledonica* and *Spyridium globulosum*) are able to slow water uptake. However, not all Rhamnaceae that grows in a seasonal rainfall environment exhibit slow water uptake (Turner et al., 2005). The identification of another Rhamnaceae, *A. neocaledonica* that exhibits slow water uptake and comes from a seasonal environment rainfall environment provides another species for research into the factors that determine water uptake rates in seeds

It is also interesting to notice that both *A. incana* and *A. neocaledonica's* imbibition curves show similar profiles. Seed moisture increased for approximately 2 days after the start of imbibition and then reached a plateau. This profile is consistent with the two first stage of the germination process i.e. imbibitions stage and germination *stricto sensu* (Côme, 1982; Bewley, 1997).

The hot water treatment (80°C) is traditionally used by the revegetation society in New Caledonia (Ruiz, *pers. comm*.). The revegetation society leaves the seed to cool in the water for 12 hours. The data presented here shows an 80°C hot water treatment of 5 minutes gave twice as much water absorption. This may be a more effective dormancy-breaking treatment

than the current method but as germination data is not available to compare the two treatments, no conclusions can be drawn without further experimentation.

4.3 Germination

This study is the first to report *A. neocaledonica's* seed biology and seed germination. However, there are a number of reports on germination of other Rhamnaceae (Bell et al., 1987; Keogh and Bannister, 1992; Hanley and Lamont, 2000; Turner et al., 2005; Haines et al., 2007). In all the studies, physical dormancy (PY) has always been identified. In some species, for example *Discaria toumatou*, a combination of dormancy types i.e. physical and physiological dormancy (PY + PD) were identified (Keogh and Bannister, 1992). In contrast other species only exhibited PY dormancy (*Alphitonia incana*, *Cryptandra arbutiflora*, *Spyridium globulosum* (Turner et al., 2005). *A. neocaledonica* seeds germinate poorly at 25°C clearly indicating the presence of seed dormancy. In contrast, seed responded to physical scarification with sandpaper (60%) and a scalpel (51%). Hot-water treatments, with and without smoke water were able to alleviate some dormancy but were not as effective as the physical scarification treatments. None of the dormancy-breaking treatments were able to completely alleviate dormancy in the seed lot i.e. seed germination did not reach the 76% potential indicated by the tetrazolium viability test, suggesting there may be another dormancy mechanism present in *A. neocaledonica* seed. Nonetheless, for application to large-scale revegetation, the hot water bath method provides simple and low cost method for alleviating dormancy in 30-35% of the seed population. This will allow immediate emergence of some *A. neocaledonica* from the seed population while leaving some seed in the soil seed bank for subsequent emergence.

Removal of seed coat dormancy in the natural environment may be due to a number of factors. One is the iron crust surface temperature on New Caledonian ultramafic soils that often exceed 50°C under full sunshine (McCoy et al., 1999). Another is fire which is relatively common on ultramafic soil environments. The high temperatures associated with both these may facilitate cracking of the seed coat. *A. neocaledonica* is one of the pioneer plants which re-grow after fire and constitute the primary colonisation of the bare iron crust surface. *A. neocaledonica* seed is one of the soil seed bank species which may persist in rock crevices during a fire (McCoy et al., 1999). Moreover, the hot smoke water treatment at 70°C and 100°C gave significantly better germination than control seed whereas the hot water treatment at these temperatures did not. The smoke water appears to enhance germination of *A. neocaledonica* seed with hot water but with sandpaper scarification following by

germination on smoke water only 7% germination was observed. This may indicate that an excess of smoke water inhibits rather than enhances germination. Some Rhamnaceae species, *Trymalium ledifolium* (Roche et al., 1997), *Siegfriedia darwinioides* and *Spyridium globosum* (Dixon et al., 1995), respond positively to smoke treatments. Smoke allows germination to proceed by increasing the seed tissues sensitivity to gibberellic acid (Haines et al., 2007). Data from this study suggests that smoke may promote germination under some circumstances. Further investigation is required into the germination-enhancing smoke treatments and the role of gibberellic acid, if any, in their promotion of germination.

This study has identified PY dormancy as a dormancy type in *Alphitonia neocaledonica.* This is consistent with the observation that physical dormancy is the most common dormancy identified in habitats that have a distinct dry season such as savannas, hot desert, steppes, matorral (Black et al., 2006). Those conditions are also encountered in ultramafic environment where *A. neocaledonica* evolved.

Immersion of *A. neocaledonica* seeds in a water bath of 80°C alleviated dormancy by cracking the seed coat. The cracking on the seed coat was localised near the hilum region where, in general, cell structure is more fragile. The same kind of cracking has been identified in *Dichrostachys cinerea*, a mimosoid legume after exposure to a wet dry treatment. In this species the degradation of the seed surface, cracking of the seed coat, raising of the hilum and splitting of the micropyle were also observed (Kelly et al., 1992).

The optimum temperature for germination of *A. neocaledonica* is 25°C. Germination was faster at 30°C but germination only reached 28%. The optimal germination temperature of 25°C is reached from December to March in the natural environment. This is the same time that the *A. neocaledonica* seeds are mature. The dormancy identified in seed of *A. neocaledonica* will act to delay germination for 12 months when conditions for germination are optimum.

4.4 Chemical composition

Protein is the major storage reserve (14.67 ± 1.12%) in *A. neocaledonica* seed. This percentage of food reserves stored as protein is in accordance with that reported in the literature for other Rhamnaceae, for example *Ziziphus spina-christi* (15.9%) (Nazif, 2002). The second major reserve appears to be lipids with 11.76 ± 1.44%. The neutral lipid percentage in another lot of *A. neocaledonica* seeds was found to be 19.25% (Bombarda et al., 2010). The two seed lots were from different populations confirming the observation already reported for other species that seed oil content can vary with provenance (Younis et al., 2000;

Rao et al., 2008). Nonetheless, the lipid quantity is similar to that reported for the Australian native Rhamnaceae, *Alphitonia excelsa* (11.8%) (Sundar and Sino, 1992) and it is within the range report for other Rhamnaceae: *Ziziphus spina-christi* (2.3%) (Nazif, 2002); *Berchemia discolor* (11%); *Rhamnus frangula* (41.9%); *Ziziphus mauritiana* (29.3%) (SOFA, 2009).

The ability to store seeds is critical to their use in revegetation programmes. The low (< 10%) seed moisture content (8.89 ± 0.2%) suggests that seed of *A. neocaledonica* is able to tolerate desiccation and that its storage behaviour is orthodox (Côme and Corbineau, 2006) and that long term conservation at low temperature is possible. This has been confirmed by L'Huillier et al. (2010) who report that 4 years of conservation in these conditions did not reduce the seed germination percentage.

Storage reserves, particularly the presence of lipid reserves, can affect seed storage requirements. High lipid containing seeds require storage at lower moisture for optimum storage (Vertucci and Roos, 1990). The presence of lipid reserves in *A. neocaledonica* suggest that a storage moisture content lower than that at collection (9%) may be required to maximise storage life.

Conclusion

This is the first comprehensive report on the structure, composition of the seed storage reserves, and the germination behaviour of *A. neocaledonica* seed. It is a preliminary step in developing an understanding of the basic seed characteristics of *A. neocaledonica*. This understanding is critical to the improvement and optimisation of the vegetation programmes being undertaken in New Caledonia. Indeed, *A. neocaledonica*, which is considered to be one of the most efficient pioneer species, is used extensively in revegetation programmes. The data gathered from this study has been recently used to develop techniques for pre-treating *A. neocaledonica* seeds with hot water. These have been incorporated in hydroseeding experiments *in situ* to evaluate their effectiveness in improving revegetation process. Results from this study will be reported at a later date.

Another key factor will be the manipulation of the seed germination using priming methods with mycorhize germination in order to optimise the root's mycorhization and to allow a faster development of the plantlet. This could contribute to the success of pioneer plant re-introduction.

The ultimate goal will be to boost the restoration process via the management and the re-expanding of topsoil to optimize the soil seed bank, the establishment of native Cyperaceae

species and the faster ligneous pioneer species in order to reduce erosion, to regulate water flux and contribute to the conservation of biodiversity.

Finally, seed storage behaviours hypothesis i.e. low temperature (15 or 4°C) and low humidity (5 or 12% rh) will also need to be verified in order to optimise the long term conservation of seeds to avoid supply difficulties. Moreover, our knowledge on *A. neocaledonica* orthodox characteristics and on the biochemical composition of their seed storage reserves will be useful to understand ageing processes in natural conditions inside the top soil. Research into this is underway.

II.3/ Résultats de l'étude détaillée concernant les semences d'une espèce de Proteaceae pionnière : Grevillea exul ssp. *exul (Lindley)*

Grevillea exul spp. *exul* est une espèce de la famille des Proteaceae. Les Proteaceae sont bien représentées dans les zones tropicales et subtropicales de l'hémisphère sud. Cette famille comprend environ 1300 espèces dont plus de la moitié est présente sur le continent Australien.

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 43 espèces toutes endémiques réparties sur 9 genres dont 6 endémiques : *Beauprea, Beaupreopsis, Eucarpha, Garnieria, Kermadecia, Sleumerodendron* ; 2 genres subendémiques : *Virotia* et *Macadamia* ; 1 genre Australien : *Grevillea* et 1 genre Australo-Papou : *Stenocarpus*.

Il s'agit d'arbrisseaux, d'arbustes ou parfois de grands arbres, plus rarement des plantes herbacées. Ces espèces se développent tout particulièrement sur des terrains métamorphiques et ultramafiques. Elles sont généralement photophiles, xérophiles et sclérophiles (Léon, 2005).

Le genre *Grevillea* compte en Nouvelle-Calédonie 3 espèces toutes endémiques. Ce sont des arbustes ou arbres, souvent épineux (glabres en Nouvelle-Calédonie). En Nouvelle-Calédonie, ce genre autochtone comprend 3 espèces auxquelles ont été attribuées des sous-espèces.

II.3.1/ Phénologie et distribution géographique

La floraison est étalée entre juin et novembre. La collecte des fruits s'effectue en janvier et février. Concernant la distribution géographique, elle a été réalisée selon une étude de l'herbier de Nouméa située au centre IRD de Nouméa (NOU) et est présentée dans la Figure 26. Elle révèle que l'espèce *Grevillea exul* spp. exul est inféodée au milieu ultramafique néo-calédonien.

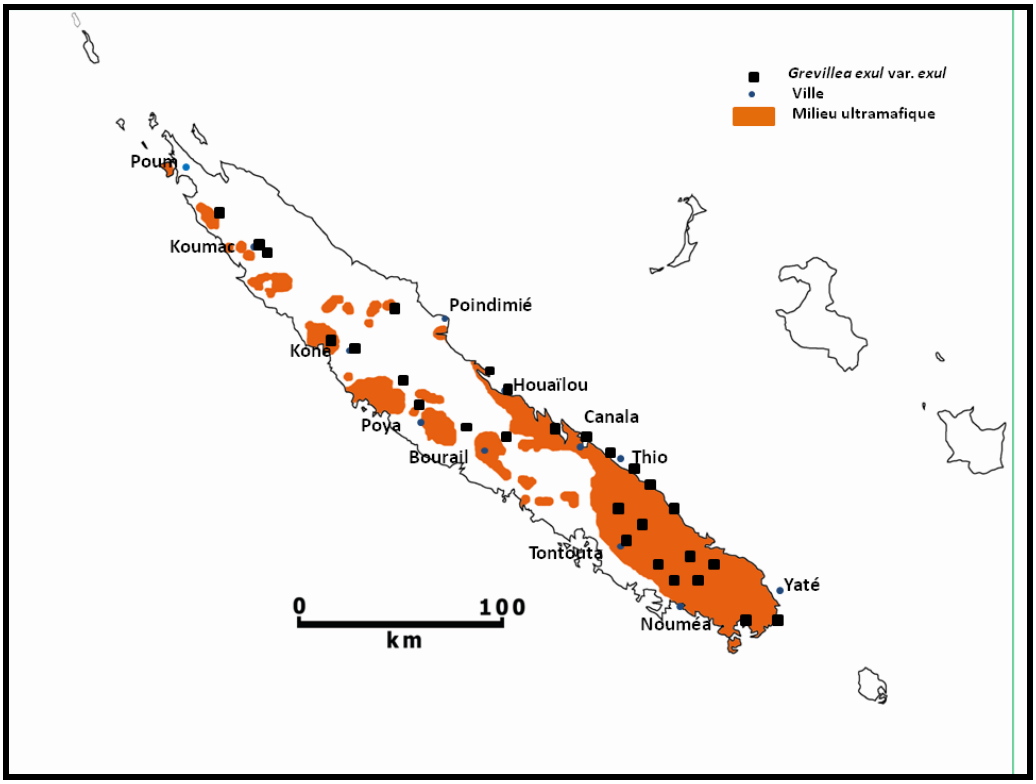


Figure 26 : Répartition de *Grevillea exul* ssp. *exul* en Nouvelle-Calédonie en relation avec les milieux ultramafiques.

II.3.2/ Origine du matériel végétal et caractéristiques climatiques de la zone de récolte

Les semences de *Grevillea exul* ssp. *exul* ont été gracieusement fournies par le service de revégétalisation de Koniambo nickel SAS. Les graines ont été récoltées durant le mois de mars de l'année 2008 au niveau du massif de Koniambo où la température moyenne annuelle est de 17,41°C, le taux d'humidité moyen de 90,09% et les précipitations de 1833,4 mm en moyenne par an. Le Tableau 2 présente une moyenne mensuelle de ces caractéristiques météorologiques durant la période allant de 2005 à 2009 calculée à partir de données brutes fournies par METEO-FRANCE.

Tableau 2 : Précipitation, température et humidité relative moyenne de la période 2005-2009 du massif du Koniambo calculées à partir de données brutes gracieusement fournies par METEO-FRANCE.

Mois	Précipitations (en mm)	Température minimale (en °C)	Température maximale (en °C)	Température moyenne (en °C)	Humidité moyenne (en %)
Janvier	239,47	18,07	25,02	20,38	89,88
Février	317,75	18,53	24,75	20,51	92,52
Mars	352,80	18,25	24,08	20,15	93,38
Avril	136,20	16,92	22,67	18,77	92,87
Mai	147,53	14,34	20,22	16,27	89,85
Juin	107,89	13,52	19,22	15,48	91,66
Juillet	95,32	11,91	17,71	13,97	89,33
Août	56,76	11,67	18,10	13,88	87,72
Septembre	58,60	12,88	20,21	15,41	88,56
Octobre	48,16	13,66	21,34	16,32	88,33
Novembre	118,60	15,57	23,40	18,26	88,81
Décembre	154,31	16,69	24,75	19,50	88,16

II.3.3/ Structure externe et interne des fruits et graines

Les fruits de *Grevillea exul* ssp. *exul* sont des follicules, bombés latéralement, brun foncé à maturité et portés par une infrutescence. Le fruit est coriace, ligneux et déhiscent, il s'ouvre par une face ventrale libérant 2 graines aplaties et faiblement ailées sur tout leur pourtour. La taille des semences est de l'ordre de 1,1-1,3 x 0,8-0,9 cm (Figure 27).

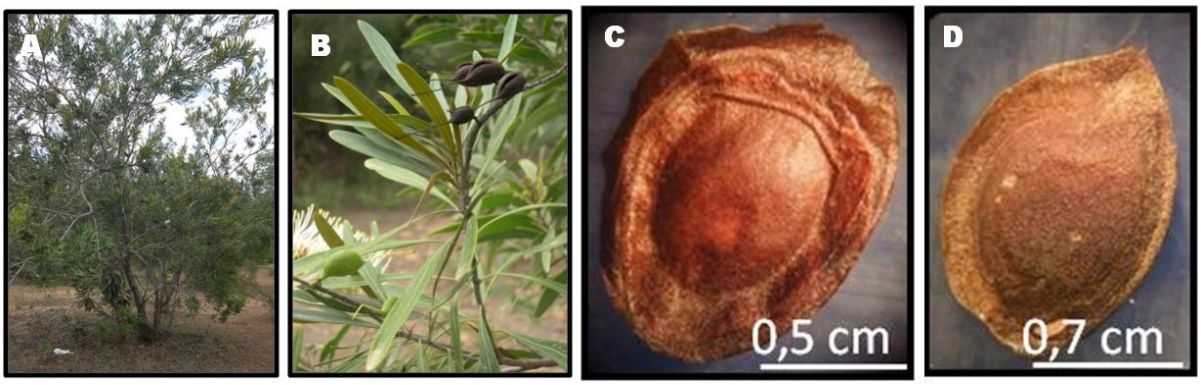


Figure 27 : *Grevillea exul* ssp. *exul*. A : Individu adulte; B : Fruit et feuille ; C : Graine en face ventrale ; D : Graine en face dorsale.

La dissection des semences met en évidence la présence d'une couche tégumentaire fine de couleur marron et d'un embryon volumineux blanchâtre occupant la totalité de la semence. Cette dernière est donc une graine de type exalbuminé (Figure 28).

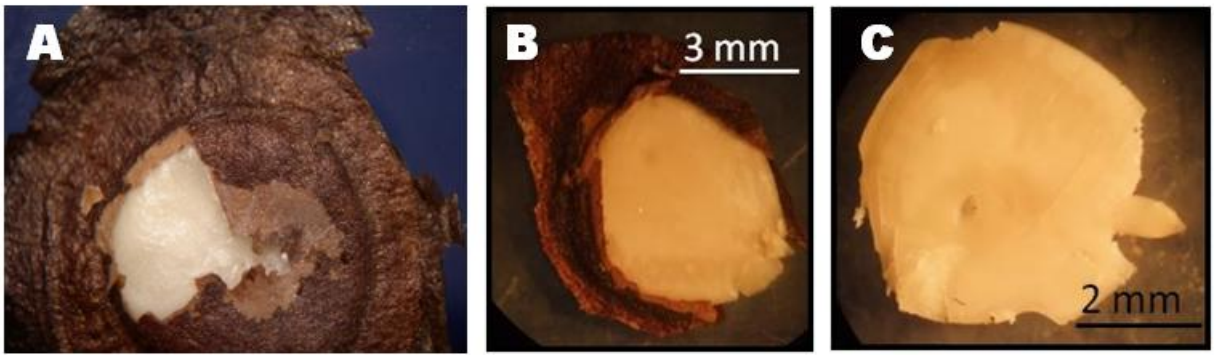


Figure 28 : Dissection de la graine de *Grevillea exul* ssp. *exul.* A : Début de scarification de la graine ; B : Embryon volumineux ; C : Embryon mis à nu et radicule de la semence.

La teneur en eau des semences de *Grevillea exul* ssp. *exul.* a été évaluée à 8,75 ± 0,003 %. La viabilité du lot utilisé est mesurée à 53 ± 12%. Le poids moyen de 100 graines et le ratio de la longueur de l'embryon sur la longueur de la semence entière ont été évalués à 2,71 ± 0,04 g et 0,54 respectivement (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques des semences de *Grevillea exul* ssp. *exul.* (E.S ratio: Ratio de la longueur de l'embryon sur la longueur de la graine. SD: Déviation standard).

Espèce	Poids moyen de 100 graines (g ± SD)	E.S ratio	Viabilité (% ± SD)	Teneur en eau (% ± SD)
Grevillea exul* ssp. *exul	2,71 ± 0,04	0,54	53 ±12	8,75 ± 0,003

II.3.4/ Ultrastructure de la semence

L'observation de coupe transversale de semence de *G. exul* ssp. *exul* confirme le type exalbuminé puisque qu'on ne distingue que les deux cotylédons accolés à un fin tégument. Les deux cotylédons sont prolongés par une radicule qui s'insère à l'extrémité du bord de la semence. Une analyse (Figure 29C) du tégument montre la présence de deux couches bien distinctes. Une couche fine, la plus externe et une plus épaisse contenant des structures en forme de dalle. Cette observation effectuée en mode rétrodiffusé a permis de révéler la

présence de cristaux de calcium en grand nombre au niveau du tégument. L'observation et l'analyse (non reporté) de ces cristaux semble montrer qu'il s'agit de cristaux d'oxalate de calcium en forme de dalle (Figure 29).

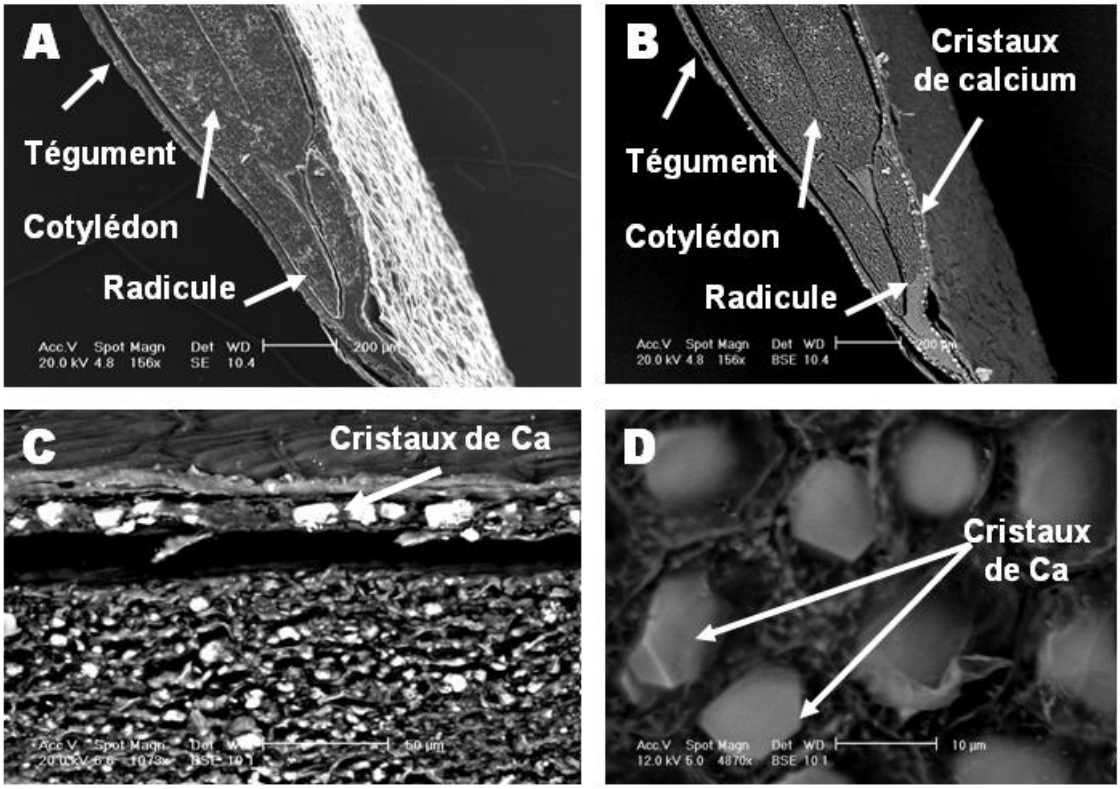


Figure 29 : Photographies réalisées au microscope électronique à balayage. A : Coupe transversale de graine de *G. exul* ssp. *exul* en mode secondaire ; B : Même photo que la A en mode rétrodiffusé ; C : Agrandissement du tégument et de l'embryon. D : Agrandissement des cristaux d'oxalate de calcium du tégument.

II.3.5/ Germination et optimisation de la température de germination

La germination de *G. exul* ssp. *rubiginosa* ayant été étudiée au sein du laboratoire par Léon (2005) et n'ayant montré aucune dormance suggérait le même caractère pour *G. exul* ssp. *exul*. C'est la raison pour laquelle une étude de détermination de la température optimale de germination de *G. exul* ssp. *exul* a directement été lancée.

L'optimisation de la température de germination révèle que les meilleures températures sont de l'ordre de 20 à 35°C avec des taux de germination assez élevés (51 ± 12% pour 20°C, 53 ± 10% pour 25°C, 42 ± 18% pour 30°C, 30 ± 24% pour 35°C).

L'optimum en température de germination est obtenu après 14 jours à 25°C avec 53 ± 10% de germination soit 100% des graines viables (Tableau 3) et un temps de latence de 6 jours (Figure 30).

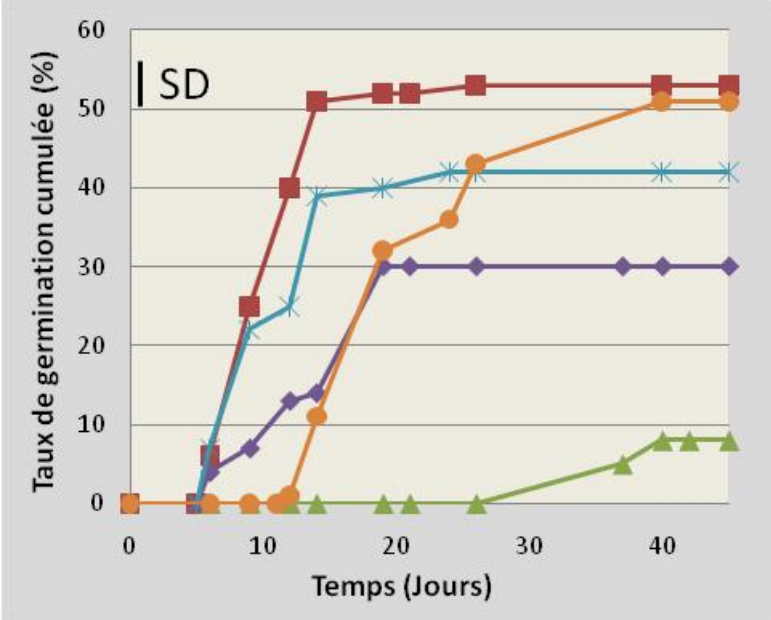


Figure 30 : Effets de la température sur la germination des semences de *G. exul* ssp. *exul*. Taux de germination cumulée en fonction du temps à une température de 15°C (▲), 20°C (●), 25°C (■), 30°C (+) ou 35°C (υ) et à la lumière. SD : Ecart type maximum observé. Moyenne de 4 répétitions.

Il existe une corrélation positive entre le taux de germination (exprimé par le T50) et la température de 0 à 25°C. Pour les températures supérieures, 30 à 40°C, il y a une corrélation négative.

En utilisant des droites de régression, la température optimale est donnée par leur intersection (Özbingöl et al.,1998). Elle est donc de 27°C. L'extrapolation de ces deux droites donne la température minimale de germination de 13°C et la température maximale de germination de 43°C.

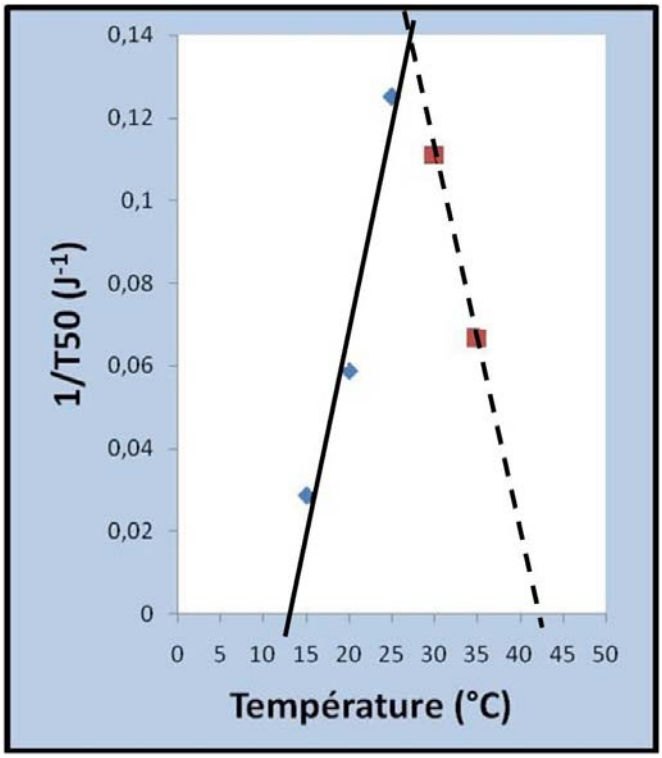


Figure 31 : Détermination de la température optimale de germination via des droites de régression (Özbingöl et al.,1998).

II.3.6/ Composition biochimique des réserves séminales

La composition biochimique des graines de *G. exul* ssp. *exul* est majoritairement lipidique avec 34,43 ± 2,34%. Cette fraction est suivie par la fraction protéique qui représente 19,28 ± 1,76% et enfin la fraction des glucides hydrosolubles qui représente seulement 3,29 ± 0,14% (Figure 32).

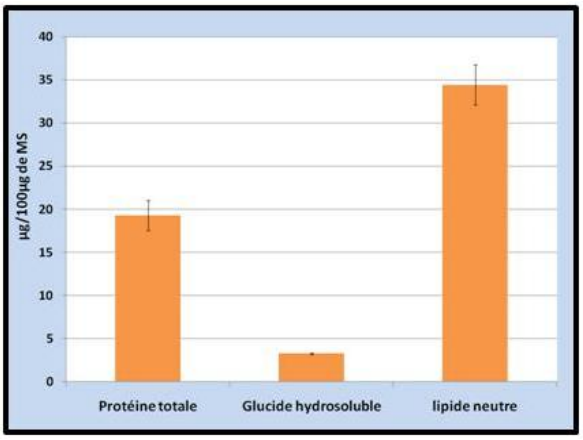


Figure 32 : Composition biochimique des réserves séminales de *G. exul* spp. *exul*

L'analyse de la composition en acide gras de la fraction lipidique neutre a pu mettre en évidence plus de 80% des acides gras constitutifs du total des acides gras. Les résultats de cette analyse montrent une prédominance des acides gras insaturés avec 70% du total des acides gras. Un autre fait marquant résultant de l'analyse de la composition en acide gras de la semence est la quantité importante d'acides gras monoinsaturés (73,21%) qui représente la quasi-totalité des acides gras insaturés (74,31%). Enfin, il faut aussi noter la présence d'une série d'acides gras rares dénommés, les Omega 5. En effet, ces derniers représentent 39,96% du total des acides gras.

Tableau 4 : Composition des acides gras constitutifs de la fraction lipidique des graines de *G. exul* ssp. *exul.*

Nombre de Carbonne	Nom systématique	Nom commun	% des acides gras du total des acides gras
C 14:0	Tétradécanoique	Myristique	tr
C 14:1Δ9	cis-9-Tétradécanoique	Myristoleique	1,28
C 16:0	Hexadécanoique	Palmitique	0,77
?			0,33
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadécanoique	Palmitoleique	0,22
C 16:1Δ11			20,80
C 17:1Δ10			0,18
C 18:0	Octadécanoique	Stéarique	1,32
C 18:1Δ9	cis-9-Octadécanoique	Oléique	30,07
C 18:1Δ11			
C 18:1Δ13			9,58
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadécadienoique	Linoléique	1,10
C 20:0	Eicosanoique	Arachidique	0,79
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoique	Eicosénoique	1,28
C 20:1Δ15			1,89
C 22:0	Docosanoique	Béhénique	1,00
C 22:1Δ13	cis-13-Docosénoique	Erucique	0,48
C 22:1Δ17			2,06
C 24:0	Tétracosanoique	Lignocérique	1,88
C 24:1Δ15	cis-15-Tétracosenoique	Nervonique	1,02
C 24:1Δ19			4,35
Total des acides gras identifiés de la graine (mg/g)			80,40

L'occurrence de ces acides gras atypiques a également été étudiée en détail au sein de semences de *Grevillea exul* ssp. *rubiginosa* et d'*Alphitonia neocaledonica* où cette famille d'acide gras a aussi été retrouvée. Cette étude a fait l'objet d'une publication acceptée actuellement sous presse (DOI: 10.1007/s11746-010-1581-2) dans le Journal of American Oil Chemist's Society qui est présentée ci-dessous.

II.3.7/Article concernant l'occurrence d'une série d'acide gras atypiques (ω5) chez *Grevillea exul* ssp. *rubiginosa* et *Alphitonia neocaledonica*

II.3.7.1 Etat de l'art

La Nouvelle-Calédonie est reconnue pour sa grande biodiversité avec une endémicité globale de 74,3%. Ce taux important d'endémicité est le résultat de plusieurs facteurs: Sa séparation tardive de l'Australie, les variations climatiques du à la topographie de l'île et la multitude de substrats géologiques avec un tiers de la surface totale de la Nouvelle-Calédonie recouverte de roches ultramafiques (Jaffré et al., 2004). L'érosion et l'altération de ces roches ont conduit à un enrichissement des sols en métaux lourds et un appauvraissement en éléments nutritifs indispensables. Ces phénomènes ont conduient en l'apparition d'une flore unique pouvant atteindre plus de 90% d'endémicité sur ces types de sols. Deux espèces de plantes endémiques de la Nouvelle-Calédonie, toute deux poussant sur sols ultramafiques, ont été étudiés afin de caractériser leurs graines. Ces deux espèces, *Alphitonia neocaledonica* (Schltr.) Guillamin (AN) et *Grevillea exul* ssp. *rubiginosa* (Brongn. & Gris) Virot (GER), appartenant à la famille des Rhamnaceae et des Proteaceae respectivement, sont des espèces d'intérêts de par leur utilisation dans la revégétalisation des sols ultramafiques exploités pour leurs nickels.

Leurs teneurs lipidiques et plus particulièrement la fraction lipidique neutre de ces graines ont été analysés. La composition en acide gras a été déterminé à l'aide d'une chromatographie gazeuse ainsi qu'une chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

II.3.7.2 Publication concernant les acides gras Ω5 des graines d'*Alphitonia neocaledonica* et de *Grevillea exul* ssp. *rubiginosa*

Cette publication intitulée « Fatty acids profile of *Alphitonia neocaledonica* and *Grevillea exul* ssp. *rubiginosa* seed oils, occurence of an ω5 series» a été acceptée (DOI: 10.1007/s11746-010-1581-2) dans le Journal of American Oil Chemist's Society. Comme pour les deux précédents articles présentés dans ce manuscript, pour des raisons de lisibilité, seul les parties résultats et discussions seront présentés, et les références bibliographiques ont été intégrées dans la bibliographie finale.

Results and discussion

Moisture contents have been evaluated at 4.02 and 7.26% for *Alphitonia neocaledonica* (AN) and *Grevillea exul* var. *rubiginosa* (GER) respectively. Seed storage reserves of both species were found to be high in oil i.e. neutral lipid fraction with 19.25 and 25.60% of the dry matter of the seed for AN and GER respectively (Table 1) and can be considered as oily seeds (Rao & Sino, 1992; SOFA datavase, 2009; Özgül-Yücel, 2005; Plattner & Kleinman, 1977; Hocking, 1983; Bertoli et al., 1998; Tsevegsuren et al., 2003). AN seed oil content (19.25%) is higher than that observed in the Australian native *A. excelsa* (11.8%) (Rao & Sino, 1992); but was within the range reported for other Rhamnaceae (SOFA datavase, 2009; Özgül-Yücel, 2005): *Berchemia discolor* (11%); *Rhamnus frangula* (41.9%); *Ziziphus mauritiana* (29.3%). Similarly the GER seed oil content, at 25.6%, is within the range reported in the literature for other Proteaceae (SOFA database, 2009; Plattner & Kleinman, 1977; Hocking, 1983; Bertoli et al., 1998): *Stirlingia sinuatus* (9.7%); *Grevillea robusta* (13.8%); *G. leucopteris* (31%); *Gevuina avellana* (46%).

Table 1. Oil and water content of *Alphitonia neocaledonica* (AN) and *Grevillea exul* var. *rubiginosa* (GER) seeds

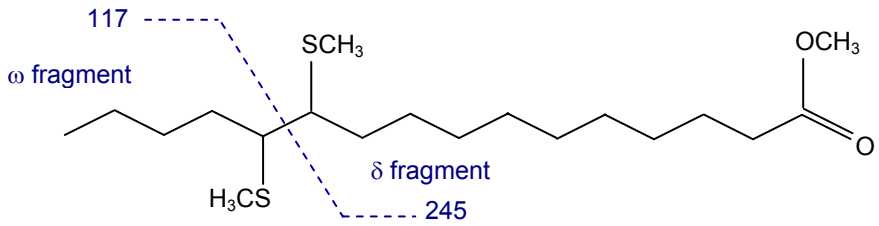
Species	Oil[a]	Water[a]
AN	19.25	4.02 ± 0.2
GER	25.60	7.26 ± 0.8

[a]percentage from dry material

Fatty acid identifications were done first using retention indices and co-elution with authentic samples (Supelco 37 Component FAME Mix). For GER in particular, identification was also made by comparison with AN profile. The infra red spectra of the two seed oils were examined in order to detect the presence of *trans*-acids or free fatty acids and no absorption was detected. Considering *Alphitonia neocaledonica*, in order to confirm the presence of unsaturated fatty acid isomers, Dimethyloxazoline (DMOX) and Dimethyldisulfide (DMDS) derivatives (Yang et al., 1989) were prepared and analysed by GC-MS. DMDS and DMOX characteristic fragments used for the identification of the monoene and polyene positions are presented in Table 2.

Table 2. Characteristic fragments of the *Alphitonia neocaledonica* (AN) DMDS and DMOX derivatives

		DMDS			DMOX
Fatty acid	**MW**	**δ**	**δ - MeOH**	**ω**	
14:1**ω5**	334	217	185	**117**	
16:1ω7	362	217	185	145	
16:1**ω5**	362	245	213	**117**	307, 236
18:1ω9	390	217	185	173	335, 208
18:1ω7	390	245	213	145	
18:1**ω5**	390	273	241	**117**	335, 264
20:1ω11	418	217	185	201	
20:1ω9	418	245	213	173	
20:1**ω5**	418	301	269	**117**	
18:2ω6					333, 208, 248
18:3 ω3					331, 208, 248, 288



Structure of the 16:1 ω5 DMDS derivative

The ω5-monoenes were characterized from the mass spectrum of the fatty acid DMDS adducts that gave the expected ω fragment at m/z 117 (145 and 173 for ω7- and ω9-monoene respectively). The ester group also lost MeOH to provide a prominent secondary fragment ion (δ-MeOH). There is a high percentage of unsaturated fatty acids in both species (AN: 79.9%; GER: 87.1%) leading to a relatively low saturated to unsaturated ratio (AN: 0.20; GER: 0.07) (Table 3).

Table 3. Fatty acid composition of *Alphitonia neocaledonica* (AN) and *Grevillea exul* var. *rubiginosa* (GER) seed oil[a]

		Family	**Rhamnaceae**	**Proteaceae**
ECL[b]		*Genus and species*	*Alphitonia neocaledonica*	*Grevillea exul* var. *rubiginosa*
14	Saturated fatty acid	14:0	0.07	Tr
16		16:0	10.00	1.37
18		18:0	4.21	0.75
20		20:0	0.51	0.59
22		22:0	0.65	1.35
24		24:0	0.36	1.75
14.79	Unsaturated fatty acid	14:1Δ9 (ω5)	0.16	8.50
16.57		16:1Δ9	0.25	Tr
16.76		16:1Δ11 (ω5)	10.65	45.58
18.52		18:1Δ9	12.66[c]	20.94
18.54		18:1Δ11	1.23[c]	-
18.75		18:1Δ13 (ω5)	10.49	9.31
-		20:1Δ9	ni[d]	-
20.47		20:1Δ11	0.21[c]	Tr
20.72		20:1Δ15 (ω5)	0.24	-
19.37		18:2Δ9,12	23.62	2.11
20.47		18:3Δ9,12,15	20.38	0.68
	Total	Saturated	15.80	5.81
		Unsaturated	79.89	87.12
		ω5	21.54	63.39

[a]relative GC percentage obtained on MEGA10 capillary column. [b]Equivalent Chain Length on MEGA 10 column. [c]18:1Δ9 and 18:1Δ11 are coeluted on the MEGA 10 column (total 13.83%) but the relative GC percentage can be obtained by considering the ratio 18:1w7/18:1w9 (9/91) on DB-23 capillary column. [d] not integrated. Tr: Traces

In the case of AN, the ratio appears to be in accordance with the others species of Rhamnaceae but for GER, the ratio value is one of the smallest with *Gevuina avellana* (0.07%) actually found in the Proteaceae family (Table 4).

Table 4. Characteristics of some species seed oils belonging to Rhamnaceae and Proteaceae families

	Species	Oil content (%)	Unsaturated (unsat) fatty acids (%)	Saturated (sat) fatty acids (%)	Sat/ unsat ratio	MUFA[a]	PUFA[b]	ω-6/ ω-3 ratio
Rhamnaceae	*Alphitonia neocaledonica*	19.25	79.89	15.80	0.20	35.89	44	1.16
	Alphitonia excelsa [3]	11.2	80.10	19.70	0.25	30.00	50.1	4.69
	Ventilago calyculata [4]	40.0	81.20	18.70	0.23	63.10	18.1	0.33
	Berchemia discolor [4]	11.0	70.00	30.00	0.43	52.00	18	17
	Paliurus aculeatus [4]	-	82.40	16.60	0.20	39.40	43	85
	Emenospermapancheranum[4]	13.2	85.40	14.50	0.17	23.40	62	8.84
	Ziziphus mauritiana [4]	29.3	79.50	18.90	0.24	67.10	12.4	-
Proteaceae	*Grevillea exul* var. *rubiginosa*	25.6	87.12	5.81	0.07	84.33	2.79	3.1
	Grevillea decora [4]	-	78.90	8.70	0.11	77.60	1.30	5.5
	Grevillea robusta [13]	13.3	84.70	14.30	0.17	83.40	1.30	3.3
	Grevillea banksii [12]	-	86.80	13.20	0.15	84.20	2.60	-
	Kermadecia sinuata [12]	40.3	84.20	15.80	0.18	81.60	2.60	-
	Beauprea balansae [12]	-	66.70	33.30	0.50	39.50	27.2	-
	Beauprea neglecta [12]	51.7	81.40	18.60	0.23	53.9	27.5	-
	Gevuina avellana [8]	46.0	93.20	6.50	0.07	87.50	5.70	5.4
	Stirlingia sinuatus [3]	9.7	87.00	12.40	0.14	85.20	1.80	8.0
	Stirlingia simplex[3]	5.1	90.00	10.00	0.11	87.20	2.80	8.3
	Stirlingia tenuifolia[3]	1.6	87.20	12.90	0.15	75.90	11.30	-

[a] Monounsaturated fatty acids; [b] Polyunsaturated fatty acids

For AN, the most represented fatty acids are linoleic (LA) (23.6%), α-linolenic (ALA) (20.4%) and oleic acids (12.7%). The high content in essential fatty acids confers a potential nutritional value to this oil especially since the relative proportion of unsaturated fatty acids is high (79.9%) and the two major fatty acids of *Alphitonia neocaledonica*'s oil are the precursors of the omega 3 and omega 6 fatty acid family respectively. According to Dubois et al. (2007), AN's oil belongs to the PUFA class characterised by a major quantity of polyunsaturated fatty acid (44%) and to the LA+MUFA subclasses (Table 4). This classification is due to a large amount of linoleic acid (23.62%) and monounsaturated fatty acid (35.89%) in its seed oil. Moreover, AN's oil appears to be an interesting nutritional source. Indeed, α-linolenic acid content (20.38%) in AN seed oil is higher than in soybean seed oil (7.8%), and ω-6/ω-3 ratio is close to 1, providing a good equilibrium between these two essential fatty acids. C16:1 was also present in a considerable quantity (10.9%) since its concentration rarely exceeds 10% in most seed oils and animal fats (Vickery, 1971).

In the case of GER, the unusual C16:1ω5 predominates accounting for 45.58% of the total fatty acids, followed by oleic acid (20.94%) and the two others unusual monounsaturated fatty acids C18:1ω5 (9.31%) and C14:1ω5 (8.50%). The monounsaturated fatty acid amount of 84.33% classifies GER seed oil in the MUFA class and subclass (Aitzetmuller, 2004). From a nutritional point of view, GER's oil could be interesting because of its ratio ω-6/ ω-3 and because of its low amount of saturated fatty acids (5.8%) similar to *Gevuina avellana* seed oil. The high content of the unusual C16:1ω5 (45.58%) and the lack of information on the dietary effects of consuming such high concentrations of this fatty acid means there is a need for caution, however, *G. avellana* nuts (22-24% of C16:1ω5) have been eaten for a long time in South America (Bertoli et al., 1998).

It is also interesting to highlight the high quantity of ω5 fatty acids in both AN and GER (AN: 21.5%, GER: 63.4%), with a predominance of the C16:1ω5 representing 49.4% and 71.9% of the total ω5 monoenes respectively (Table 3). The ω5 fatty acids rarely occur in plants. The broad spectrum of ω5 monoenes could be due to the presence in the seed of either a highly active ω5 desaturase (Tsevegsuren et al., 2003) or an elongase responsible for a considerable chain elongation (Vickery, 1971). The unusual C16:1ω5 fatty acid has only been reported in some Proteaceae and Primulaceae (Tsevegsuren et al., 2003; Vickery, 1971; Aitzetmuller, 2004). The presence of ω5 fatty acids in Rhamnaceae has been only reported in the fruit pulp of *Ziziphus jujuba* var. *inermis* but never with this broad spectrum. Moreover, it has never been detected in Rhamnaceae seeds. The GER C16:1ω5 value (45.6%) seems to be the highest reported until thus far, the nearest being *Kermadecia sinuata* (40.3%)

(Aitzetmuller, 2004). This latter is also endemic to New Caledonia and belongs to the same family, but grows under different type of soil i.e. sedimentary substrate and different climatic conditions i.e. humid forest. It thus appears that the occurrence of this fatty acid is not related to the environment but is strictly due to a family feature. Indeed, Vickery (Vickery, 1971) have identified its presence in numerous Proteaceae species including three endemic to New Caledonia, *K. sinuata*, *Beauprea balansae*, *B. neglecta*, the latter two growing on ultramafic soils.

Conclusion

To conclude, the patterns of occurrence and concentrations of the fatty acids contained in the seed oil suggest they could be a good source of ω5 monoenes, especially GER. The fatty acid profile of GER is in accordance with those reported by Vickery (1971) for the genus *Grevillea* i.e. the occurrence of long chain saturated fatty acids (C22:0, C24:0) and low amounts of palmitic and linoleic acid amounts. However, GER does not contain the C22:1 and C24:1 fatty acids found in other *Grevillea* species. *Alphitonia neocaledonica* can be at the moment considered as an exception within the Rhamnaceae family. Our next objectives will be to compare these profiles with others New Caledonian *Grevillea* and *Alphitonia* species that inhabit the same dry environment and exclusively grow on ultramafic rocks (L'Huillier et al., 2010). Also, New Caledonian Proteaceae and Rhamnaceae species will be study in relation to their environment (soil, climatic conditions...).

II.3.8/ Discussion sur les résultats obtenus concernant l'étude détaillée de *G. exul* ssp. *exul.*

a/ Caractéristiques de la semence

a.1/ Structure du fruit

Grevillea exul spp. *exul* produit une quantité relativement abondante de fruits (observation personnelle). Ce sont des follicules très lignifiés. Lamont et Groom (1998) ont défini 4 types de graines de Proteaceae selon les syndromes écologiques qu'elles développent. L'aspect lignifié des follicules classe donc *G. exul* spp. *exul* comme étant une espèce du « Syndrome

1 ». Toutefois, d'autres paramètres écologiques permettent de le classer ainsi. En effet, le maintien et le stockage des semences à l'intérieur des follicules et sur le pied mère pendant une certaine période après maturation des graines, l'aspect lignifié et le type de fruit (follicule), la présence d'une partie ailée jouant certainement un rôle dans la dispersion de la semence, la présence d'un fin tégument au niveau de la graine et enfin le caractère sérotineux du fruit permettent de classer les graines de *G. exul* spp. *exul* dans la classe dénommée « Syndrome 1 » (Lamont et Groom, 1998). Ainsi, *G. exul* spp. *exul* est apparentée, au moins du point de vue écologie des semences des Proteaceae au genre *Banksia* et *Hakea*, ce qui le diffère notamment des autres espèces du genre *Grevillea* reconnu comme appartenant à la classe dénommée « Syndrome 4 ». Cette classe regroupe des espèces de Proteaceae dont les traits principaux sont : le caractère non-sérotineux, les fruits non lignifiés et les téguments de la graine durs et épais.

Lamont et Groom (1998) ont montré que les espèces de Proteaceae à fruit lignifié sont prédominants voire dominants dans les végétations sclérophylles australiennes sujettes aux feux et pauvre en nutriments. Ces caractéristiques édaphiques et florales sont similaires aux conditions que l'on peut retrouver au niveau des maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie où *G. exul* spp. *exul* évolue.

S'agissant des espèces à caractère sérotineux, leurs fruits peuvent être maintenus sur le pied mère à plus ou moins long terme, tel le cas de *G. exul* spp. *exul*. Les graines sont libérées du fruit en réponse à des signaux bien précis comme un passage du feu mais aussi dans certains cas, suite à des dommages subis par la plante mère ou une sécheresse importante (Lamont et Groom, 1998).

a.2/ Poids et teneur en eau de la graine

La graine de *Grevillea exul* spp. *exul* pèse 27,1 ± 0,4 mg et comparée aux graines d'autres espèces du genre *Grevillea*, *G. shiressii* (25 ± 1 mg), *G. speciosa* (28 ± 1 mg), *G. linearifolia* (27 ± 1 mg), *G. leucopteris* (46 mg), *G. wilsonii* (121 mg), *G. caleyi* (318 ± 7 mg), embryon de *G. annulifera* (120 mg), cette dernière est plutôt de petite taille (Auld et Denham, 1999). Si l'on considère la famille des Proteaceae dans son ensemble, la graine de *G. exul* spp. *exul* est l'une des plus petites, en effet seules quelques espèces développent des graines de masse inférieure à celles de *G. exul* spp. *exul* (*Banksia coccinea* : 14 mg *; Dryandra formosa* : 10 mg), la majorité étant supérieure en masse (embryon de *Macadamia integrifolia* : 1990

mg ; *Xylomelum angustifolium* : 756 mg ; *Hakea undulata* : 32 mg ; *Banksia hookeriana* : 32 mg). Il est intéressant de noter que la plupart des graines ayant une masse proche de *G. exul* spp. *exul* appartient à la classe de graines de type écologique dit de « Syndrome 1 » renforçant ainsi nos affirmations antérieures (Lamont et Groom, 1998).

Lamont et Groom (1998) ont également défini l'intensité du caractère sérotineux des semences du genre *Hakea* à partir de deux critères, le type de multiplication développé par les semences (sexuée ou végétative) et la masse des graines. Ils l'ont aussi évalué, dans un deuxième temps, en fonction du caractère lignifié du fruit, de sa masse et enfin de la masse des graines. Si l'on se réfère à ces deux études et aux critères qu'elles prennent en compte, les semences de *G. exul* spp. *exul* développent un caractère sérotineux faible du fait de la masse faible de la semence et du fait qu'elle rejette sans problème après le passage d'un feu (Observation personnelle).

La faible (< 10%) teneur en eau des graines de *G. exul* spp. *exul* (8,75 ± 0,003 %) suggère une semence de type orthodoxe (Côme et Corbineau, 2006). Ces dernières sont donc stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

a.3/ Structure externe et interne de la graine

L'observation de la structure externe et interne (Figure 28) de la graine de *Grevillea exul* spp. *exul* montre que le tégument est fin et l'embryon volumineux occupant la totalité de la graine (graine de type exalbuminé). Ces observations sont confirmées par une étude menée au microscope électronique à balayage (Figure 29).

Bien que les téguments des semences du genre *Grevillea* soient perméables à l'eau, ces derniers jouent un rôle important dans la dormance développée par ces espèces (Morris et al., 2000 ; Baker et al., 2005, Briggs et Morris, 2008). Certains auteurs ont donc manifesté un intérêt dans l'approfondissement des connaissances des structures constituants les téguments des graines des espèces du genre *Grevillea* afin de mieux appréhender les phénomènes de dormance (Briggs et al., 2005 ; Briggs et Morris, 2008).

Concernant *Grevillea exul* spp. *exul*, l'analyse au microscope électronique à balayage a pu mettre en évidence la présence de deux couches tégumentaires. La plus interne est ponctuée par de nombreux cristaux d'oxalate de calcium en forme de dalle. Les Proteaceae sont connues pour développer des semences bitegmiques constituées d'un testa (formé à partir du tégument externe de l'ovule) et d'un tegmen (formé à partir du tégument interne de l'ovule). L'étude anatomique et histochimique des téguments menée par Briggs et al. (2005) concernant *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* et *G. sericea* et l'étude menée par Briggs et Morris (2008) sur la perméabilité des téguments de *G. linearifolia* rapportent la présence au niveau de ces semences de trois épidermes constituants le testa (exo, meso et endostesta) et la présence d'un tegmen. Un élément flagrant des téguments qui peut être rapporté est l'extrême finesse des téguments des semences de *G. exul* spp. *exul*. En effet, l'épaisseur du tégument qui avoisine 23 µm ne représente pas grand-chose comparé aux téguments des semences étudiées par Briggs et al. (2005) et Briggs et Morris (2008), qui avoisine au minimum 150 µm. Cependant, la taille des téguments de *G. exul* spp. *exul* se rapproche sensiblement des valeurs que l'on peut mesurer pour *G. exul* spp. *rubiginosa* (environ 30 µm) (Léon et al., 2005). Un autre aspect original de l'analyse des téguments des semences de *G. exul* spp. *exul* est la présence abondante de cristaux d'oxalate de calcium au sein de cellules du tégument. Briggs et al. (2005) ont aussi noté la présence de structures de forme cubique localisées dans la couche de l'endotesta et ils notent que ce dernier présente une zone de concentration de cristaux. La couche de cellule contenant les cristaux d'oxalate de calcium serait probablement la couche interne du testa (endotesta) qui, selon Briggs et al. (2005) fusionnerait avec le tegmen pour former l'aile qui contourne la semence.

L'occurrence des cristaux d'oxalate de calcium au sein des cellules du tégument des semences a largement été montrée chez *G. exul* spp. *rubiginosa* (Léon et al., 2005). Etant donné que *G. exul* spp. *exul* évolue dans le même milieu que *G. exul* spp. *ruginosa*, qu'il s'agit de deux sous espèces proches et que la répartition des cristaux de calcium est similaire, il paraît logique de leur attribuer les mêmes fonctionnalités.

Les deux fonctions principales les plus connues attribuées à ce type de cristaux de calcium sont (Jaúregui-Zúñiga, 2003) :

- Un mode de réserve du calcium pour la semence et son métabolisme.
- Une protection de la semence contre des agents pathogènes de toutes sortes (bactérie, champignons, herbivorie)

Léon et al. (2005) ont émis par ailleurs l'hypothèse d'un éventuel mécanisme que pourrait jouer ces cristaux d'oxalate de calcium dans l'exclusion du nickel au niveau des téguments de la semence de *G. exul* spp. *rubiginosa* espèce définie comme résistante au nickel. Cette fonction a été mise en évidence sur des graines mises à germer avec ou sans, différentes concentrations de Ni. Du fait de la pauvreté en calcium des sols issus de roche ultramafique de la Nouvelle-Calédonie (rapport Ca/Mg faible) et de l'occurrence des cristaux de Ca qui dépendent étroitement de la disponibilité en Ca, Léon et al. (2005) suggère que les individus adultes de *G. exul* spp. *rubiginosa* ont la capacité d'accumuler dans leurs semences suffisamment de Ca pour entrainer la formation de cristaux. Cette accumulation pourrait se baser sur des mécanismes développés par les plants adultes de *G. exul* spp. *rubiginosa* pour extraire du sol des quantités importantes de calcium ou sur une capacité à recycler le calcium déjà présent dans la plante. On peut penser mais il reste à le confirmer que *G. exul* spp. *exul* possède ces mêmes propriétés.

L'observation de la semence révèle par ailleurs une graine de type exalbuminé, ce qui est en accord avec ce que l'on peut retrouver dans la littérature (Kausik, 1939 ; Briggs et al., 2005 ; Briggs et Morris, 2008). L'embryon est donc très volumineux, ce qui entraine une valeur du ratio Embryon/Graine important (0,54). Cette valeur s'inscrit dans la moyenne des valeurs observées pour différentes Proteaceae (0,59 ± 0,2) (Forbis et al., 2002). Selon la classification de Martin proposé en 1946, de même que pour *G. scapigera* (Baker et al., 2005), l'embryon des semences de *G. exul* spp. *exul* serait de type axial, folié et invaginé (investing) (Black et al., 2006; Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006).

b/ Germination

La thèse de Léon (2005) menée en partie sur des semences de *G. exul* spp. *rubiginosa* a permis d'identifier une absence de dormance chez cette graine. Ainsi, concernant les semences de *G. exul* spp. *exul*, nous avons directement entrepris la recherche de la température optimale de leur germination.

Les expérimentations ont conduit à des taux de germination de 100% des graines viables et un temps de latence de 6 jours pour des incubations à la lumière, à 25°C. Le taux maximum de germination est atteint au bout du 14ème jour d'incubation. Il n'y a donc pas de dormance développée par cette espèce. Concernant les espèces du genre *Grevillea*, énormément de travaux ont été dédiés à la levée de dormance induite par les téguments (Morris et al., 2000 ; Baker et al., 2005 ; Briggs et al., 2005 ; Briggs et Morris, 2008) et très peu ont relevé le caractère non-dormant au sein des espèces du genre *Grevillea (G. exul* spp. *rubiginosa*, Léon, 2005 ; *G. kennedyana*, Richter et al., 2001 ; *G. pteridifolia*, Baskin et Baskin, 2004). Le caractère non dormant des semences de Proteaceae paraît être un trait relativement important dans la catégorie des espèces développant des fruits à caractère bradyspore (se dit d'un fruit libérant ses fruits de manière graduelle) et notamment des genres *Hakea* et *Banksia* (Lamont et Groom, 1998 ; Myerscough et al., 2001 ; Offord et al., 2003). Ainsi, le caractère non dormant des semences de *G. exul* spp. *exul* et de *G. exul* spp. *rubiginosa* serait corrélé à la structure du fruit et par voie de conséquence, à l'environnement des maquis minier. Cet aspect démontre que mis à part le déterminisme génétique qui intervient dans la mise en place de la dormance des semences, les facteurs environnementaux (climatiques et/ou édaphiques) peuvent interférer dans le déterminisme génétique et provoquer l'apparition de caractères nouveaux qui, sans nul doute, apportent un avantage certains à l'espèce considéré (Lamont et Groom, 1998).

La température optimale de germination a été identifiée à 27°C pour *G. exul* spp. *exul*, selon les courbes d'Özbingöl mais les résultats montrent que des températures de 20 et 25°C permettent malgré tout d'obtenir 100% de germination. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une plage de température où l'optimum des taux de germination peut être atteint (au moins de 20°C à 27°C). En effet, certains auteurs reportent que des semences ayant leur phase de germination durant des étés chauds et pluvieux ont des températures optimales de germination supérieures à 25°C (Lamont et Groom, 1998).

Les données phénologiques montrent que les fruits de *G. exul* spp. *exul* arrivent à maturité dès le mois de Janvier et si l'on considère l'aspect sérotineux faible des fruits de *G. exul* spp. *exul* :

- D'un, il est plus avantageux pour la semence de germer assez rapidement durant les mois qui suivent la maturation des graines puisque les précipitations sont à leur niveau les plus hauts, ce qui augmente la teneur en eau des sols à un taux suffisant pour la germination des semences.

- Et de deux, les températures au cours des 4 mois qui suivent la maturation des graines avoisinent les températures optimums de germination (mois de Février à Mai où les moyennes des températures maximales oscillent entre 20 et 25°C).

c/ Composition biochimique

Les graines de *G. exul* spp. *exul*, sont des semences oléagineuses. La teneur en lipide neutre (34,43 ± 2,34%) est supérieure aux valeurs retrouvées pour des espèces de la famille de Proteaceae et notamment de ceux du syndrome 1 tel que les *Banksia*, les *Hakea*, les *Dryandra* et les *Xylomelum* (*Banksia coccinea*, 20% ; *Dryandra formosa*, 20,1% ; embryon de *Hakea platysperma*, 25,3% ; embryon de *Xylomelum angustifolium*, 13,8%) (Lamont et Groom, 1998). La valeur retrouvée pour *G. exul* spp. *exul* est cependant inférieure à la teneur en lipide des embryons de *Macadamia interifolia*, 71,6% (type syndrome 3). En revanche, la teneur en lipides neutres des semences de *G. exul* spp. *exul* reste tout de même proche des teneurs trouvées pour des espèces du genre *Grevillea* (syndrome 4), embryon de *G. annulifera*, 29,9% (Lamont et Groom, 1998); *G. leucopteris*, 31% (Hocking, 1983) ; *G. robusta*, 13,8% (Plattner et Kleiman, 1977), *G. exul* spp. *rubiginosa*, 25,60% (Bombarda et al., 2010).

Concernant la fraction protéique de la semence de *G. exul* spp. *exul*, la valeur trouvée (19,28 ± 1,76%) est proche des valeurs reportées pour les espèces du genre *Grevillea* (syndrome 4), embryon de *G. annulifera*, 34,1% ; *G. leucopteris*, 15,5% ; *G. wilsonii*, 24,8% et elle est très inférieure aux valeurs reportées pour les espèces de semence de type syndrome 1 (*Banksia coccinea*, 63,1% ; *Dryandra formosa*, 63,7% ; embryon de *Hakea platysperma*, 43,1% ; embryon de *Xylomelum angustifolium*, 61,2%). Enfin, comparée à la teneur en protéines totales des embryons de *Macadamia interifolia* (syndrome 3) (7,8%), la valeur trouvée pour *G. exul* spp. *exul* est largement supérieure (Lamont et Groom, 1998).

En ce qui concerne la teneur en glucide hydrosoluble (3,29 ± 0,14%), nos valeurs se rapprochent des valeurs retrouvées pour la majorité des espèces de Proteaceae. En effet, Lamont et Groom (1998) et Pate et al. (1986), relèvent des teneurs en carbohydrates inférieures à 5% pour la quasi-totalité des espèces de Proteaceae qu'ils analysent.

Les espèces se multipliant par rejet de souches sont généralement mois productives de fruits par rapport aux espèces proches qui ne rejettent pas. En effet, la multiplication végétative est leur voie prioritaire de multiplication et de maintien de la population, la

multiplication sexuée ayant pour rôle, plus particulièrement la propagation et la néoformation de population. Ainsi, les espèces privilégiant la multiplication végétative, produiront une quantité moindre de fruit, par contre, ces derniers seront sensiblement plus importants en taille que les fruits produits par les espèces à multiplication sexuée (Lamont et Groom, 1998). En considérant *G. exul* spp. *exul*, la taille de la semence est relativement faible par rapport aux espèces du genre *Grevillea*, de même, comparé aux espèces de Proteaceae développant des fruits lignifiés et évoluant par multiplication végétative et notamment ceux du syndrome 1, telles les *Banksia* et les *Hakea*, la masse des semences de *G. exul* spp. *exul* est également faible. Cette caractéristique peut représenter une faiblesse en terme de vigueur des semences puisqu'il est connu que les semences de taille importante développent une meilleure adaptation dans la croissance des plantules sur des sols pauvres en nutriments. Cependant, cette faiblesse est contrebalancée par une quantité importante en réserves et notamment en considérant la fraction lipidique qui assure un avantage certain en terme énergétique durant les premiers stades de développement de la plantule et plus particulièrement sur des sols pauvre en nutriments. En effet, les espèces de Proteaceae à fruits lignifiés sont typiquement constituées de cotylédons larges et importants riches en nutriments (Lamont et Groom, 1998 ; Myerscough et al., 2001).

Une autre conséquence remarquable de la teneur importante en lipides est l'attraction importante des prédateurs. Ainsi, plusieurs auteurs ont reporté de la prédation (charançons, guêpes) et des pertes importantes des semences de nombreuses espèces du genre *Grevillea* et notamment avant la phase de dispersion, *G. shiressii*, 57% de perte ; *G. caleyi*, 20-31% ; *G. sphacelata*, *G. linearifolia* et *G. mucronulata* (entre 40-50%) (Myerscough et al., 2001). Cette prédation importante se retrouve également dans le cas des semences de *G. exul* spp. *exul*. En effet, de nombreux fruits renfermant encore les graines sont attaqués par des larves (observation personnelle).

Les semences à quantité importante en lipides requièrent des taux d'humidité faibles pour un stockage optimum. La présence des réserves lipidiques importantes suggère d'utiliser un taux d'humidité inférieur au taux d'humidité de collecte des semences afin de maximiser la viabilité de ces dernières durant le stockage (Vertucci et Roos, 1990).

Concernant la composition en acide gras, les résultats étant plus ou moins similaires aux résultats acquis concernant *G. exul* spp. *rubiginosa*, et ce dernier ayant fait l'objet d'une publication acceptée (Journal of American Oil Chemist's Society) incorporée au présent

manuscrit, les résultats seront discutés succinctement. Ainsi, les résultats concernant la composition en acide gras de la fraction lipidique montre une prédominance des acides gras insaturés (74,31%), ce qui entraîne un rapport acide gras saturés sur acide gras insaturée de 0,08. Cette valeur de ratio est supérieure à ce que l'on a pu retrouver pour *G. exul* spp. *rubiginosa* (0,07). Mais, il est important de préciser que pour ce dernier, 92,93% du total des acides gras avait pu être identifié et que dans le cas des semences de *G. exul* spp. *exul*, les acides gras ont été identifiés uniquement à hauteur de 80%, ce qui expliquerait sans doute la différence que l'on peut retrouver au niveau de ces deux valeurs. Dans tous les cas, il est important de noter que la valeurs de ratio obtenue pour *G. exul* spp. *exul*, reste tout de même l'une des plus petites que l'on peut retrouver au sein de la famille des Proteaceae avec notamment, *G. exul* spp. *rubiginosa* (0,07) (Bombarda et al., 2010) et *Gevuina avellana* (0,07) (Bertoli et al., 1998).

Concernant l'occurrence des différents acides gras, on peut noter un pic important de 30,05% coïncidant avec l'acide oléique co-élué avec un deuxième acide gras non identifié pour l'instant. On ne peut donc, leur assigner une valeur. Par contre, comme pour *G. exul* spp. *rubiginosa*, l'acide gras inhabituel C16 :1ω5 (20,80%) représente une partie importante du total des acides gras. Il est ensuite, mise à part la co-élution des deux acides gras impliquant l'acide oléique, suivi du C18 :1ω5 avec 9,58% et du C24 :1ω5 avec 4,35% du total des acides gras.

La quantité importante d'acides gras monoinsaturés (73,21% du total des acides gras) classe l'huile des semences de *G. exul* spp. *exul* dans la classe et la sous-classe des MUFA (Dubois et al., 2007). Ce qui suit nos résultats obtenus pour *G. exul* spp. *rubiginosa* (Bombarda et al., 2010).

L'occurrence d'une série d'acide gras ω5 au sein du profil d'acide gras de la fraction lipidique des semences de *G. exul* spp. *exul* (C14 :1ω5, C16 :1ω5, C18 :1ω5, C20 :1ω5, C22 :1ω5, C24 :1ω5) suggère comme pour *G. exul* spp. *rubiginosa*, l'existence d'une désaturase très active ou d'une élongase qui intervient dans l'élongation de longue chaine aliphatique (Bombarda et al., 2010). La présence de ces acides gras rares confirme l'hypothèse émise par Bombarda et al. (2010) sur un contrôle génétique de la présence de ces derniers.

III/ Résultats transversaux et discussion

Avant d'entamer cette analyse de synthèse, je tiens à indiquer que n'étant basée que sur 45 espèces se développant sur des sols issus de roches ultramafiques, elle ne pourra que fournir des tendances. Ce travail méritera d'être étendu dans les années à venir sur un nombre d'espèces beaucoup plus grand afin de confirmer ou d'infirmer ces tendances.

Mis à part quelques échantillons fournis par nos différents collaborateurs concernant des espèces évoluant sur maquis minier, les collectes personnelles de semence ont été réalisées sans à priori, principalement sur maquis minier mais aussi pour quelques espèces en forêt humide. Dans tous les cas, elles évoluent sur des sols issus de roches ultramafiques (Tableau 5).

Si on analyse la répartition des 45 espèces étudiées, il est à noter que :

- 8 espèces (18% de l'ensemble des espèces étudiées) se développent strictement en forêt dense humide
- 11 espèces (24% de l'ensemble des espèces étudiées) évoluent strictement en maquis minier
- 26 espèces (58% de l'ensemble des espèces étudiées) se développent dans au moins deux habitats différents. Cependant, celles-ci évoluent principalement sur maquis minier où nous les avons collectées.

Dans la liste des espèces étudiées, les principales familles représentées sont les Cunoniaceae (9 espèces), les Cyperaceae (4 espèces), les Myrtaceae (4 espèces) et les Proteaceae (4 espèces). Ces dernières sont avec les Casuarinaceae, les Rubiaceae et les Epacridaceae, les familles dominantes des massifs ultramafiques de la Nouvelle-Calédonie (Jaffré et al., 1987 ; Jaffré et Veillon, 1994).

Tableau 5 : Bilan des espèces récoltées de leurs habitats et de leurs sols

Famille	Genre/espèce	Habitat	Sols
Casuarinaceae	*Casuarina teres*	Maquis	Substrat ultramafique
Casuarinaceae	*Gymnostoma chamaecyparis*	Maquis	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Acsmithia meridionalis*	Maquis arbustif	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Cunonia deplanchei*	Maquis, formation paraforestière	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Cunonia macrophylla*	Maquis, formation paraforestière, forêt dense humide	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Geissois hirsuta*	Forêt dense humide, fourrès secondaire	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Geissois magnifica*	Maquis arbustif	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Geissois montana*	Forêt dense humide	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Geissois pruinosa*	Maquis arbustif, forêt dense humide	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Pancheria hirsuta*	Maquis	Substrat ultramafique
Cunoniaceae	*Pancherai vieillardii*	Formation paraforestière	Substrat ultramafique
Cyperaceae	*Baumea deplanchei*	Maquis, lisière de forêt	Substrat ultramafique et sédimentaire
Cyperaceae	*Gahnia aspera*	Maquis, forêt sèche	Substrat ultramafique
Cyperaceae	*Schoenus neocaledonicus*	Maquis	Substrat ultramafique
Cyperaceae	*Costularia comosa*	Maquis	Substrat ultramafique
Elaeocarpaceae	*Elaeocarpus kaalensis*	Maquis arbustif	Substrat ultramafique
Euphorbiaceae	*Austrobuxus carunculatus*	Maquis, forêt dense humide	Substrat ultramafique et sédimentaire
Euphorbiaceae	*Croton insularis*	Maquis, forêt dense humide et sèche	Divers substrats
Goodeniaceae	*Scaevola cylindrica*	Maquis arbustif, lisière de forêts	Substrat ultramafique et sédimentaire
Goodeniaceae	*Scaevola montana*	Maquis ligno-herbacées, fourrés humide	Substrat ultramafique et volcano-sédimentaire
Guttifereae	*Montrouziera sphaeroidea*	Maquis ou formation paraforestière	substrat ultramafique
Hippocrateaceae	*Dicarpellum baillonianum*	Forêt dense humide	Substrat ultramafique et sédimentaire
Joinvilleaceae	*Joinvillea plicata ssp. plicata*	Maquis et formation paraforestière	Substrat ultramafique et volcano-sédimentaire
Mimosaceae	*Seriantes sachetae*	Forêt humide de moyenne altitude	Substrat ultramafique, schisteux ou calcaire
Mimosaceae	*Acacia spirorbis*	Maquis, forêt sèche	Substrat ultramafiques et calcaire
Myrsinaceae	*Rapanea diminuta*	Maquis, forêt dense humide	Substrat ultramafiques et calcaire
Myrsinaceae	*Tapeinosperma sp.*	Forêt dense humide	Substrat ultramafique
Myrtaceae	*Carpolepis laurifolia var. laurifolia*	Forêt dense humide, milieu dégradé	Substrat ultramafique et sédimentaire
Myrtaceae	*Syzygium frutescens*	Maquis, formation paraforestière, forêt dense	Substrat ultramafique et sédimentaire
Myrtaceae	*Xanthostemum sulfureus*	Maquis	Substrat ultramafique
Myrtaceae	*Tristaniopsis guillainii var. guillainii*	Maquis	Substrat ultramafique
Pittosporaceae	*Pittosporum simsonii*	Maquis, forêt, formation paraforestière	Substrat ultramafique
Proteaceae	*Grevillea exul var. exul*	Maquis	Substrat ultramafique
Proteaceae	*Knightia deplanchei*	Maquis ou forêt	Substrat ultramafique
Proteaceae	*Stenocarpus milneii*	Maquis, formation paraforestière	Substrat ultramafique
Proteaceae	*Stenocarpus umbelliferus*	Maquis, formation paraforestière, forêts dense	Substrat ultramafique et sédimentaire
Rhamnaceae	*Alphitonia neocaledonica*	Lisière de forêt dense, maquis, forêt sèche	Substrat ultramafique et sédimentaire
Rhizophoraceae	*Crossostylis grandiflora*	Maquis et forêt dense humide	Substrat ultramafique et siliceux
Rubiaceae	*Pschotria baillonii*	Forêt dense humide	Substrat ultramafique et sédimentaire
Rubiaceae	*Pschotria douarrei*	Forêt dense humide	Substrat ultramafique
Rubiaceae	*Pschotria oleoides*	Forêt, formation paraforestière	Substrat ultramafique
Rutaceae	*Geijera cauliflora*	Maquis, forêt sèche	Substrat ultramafique et sédimentaire
Rutaceae	*Melicope lasioneura*	Forêt dense humide	Substrat ultramafique et sédimentaire
Sapindaceae	*Dodonea viscosa*	Maquis, forêt sèche	Substrat ultramafique et sédimentaire
Winteraceae	*Zygogynum pancheri ssp. Pancheri*	Forêt dense humide	Substrat ultramafique et sédimentaire

Avant de poursuivre plus loin les analyses, il est important de préciser que les données concernant le mode de multiplication des espèces étudiées (Tableau 7) sont non exhaustives. En effet, aucune étude spécifique sur ce trait de vie n'a été menée à notre connaissance. Les données répertoriées ont été établies à partir d'observations personnelles effectuées lors de la réalisation de mission de récolte sur le terrain et à partir de divers résultats obtenus au cours d'études ponctuelles (Jaffré et Rigault, 1989 ; Bocquet et al., 2007 ; Carpenter et al., 2003 ; L'Huillier et al., 2010). Ainsi, s'agissant des types de multiplication développés par les espèces étudiées, l'aspect intéressant à prendre en compte est l'occurrence de la multiplication végétative. En effet, cette dernière occupe une place plus ou moins importante dépendant de divers facteurs dont les plus importants sont la production de semences, la qualité de ces dernières, l'efficacité de la dissémination, l'importance des dormances et leur aptitude à la conservation.

Ainsi, les données recensées montrent que 22 espèces semblent se multiplier strictement par la voie sexuée (semences), 10 espèces ont la capacité de se multiplier végétativement et 13 espèces seraient susceptibles de développer cette capacité. Dans tous les cas, ce trait de vie semble être absent ou sinon, très peu représenté chez les espèces évoluant en forêt. Ces résultats sont cohérents avec les données bibliographiques. En effet, plusieurs auteurs ont noté une proportion importante d'espèces évoluant sur maquis minier capables de se multiplier par voie végétative (McCoy et al., 1999 ; L'Huillier et al., 2010). L'Huillier et al. (2010) reporte le rôle important joué par les rejets de souches (lignotubers ou bulbes ligneux) de la majorité des espèces ligneuses après passage d'un feu. En effet, cette étape est primordiale au démarrage d'un phénomène d'auto-succession des maquis minier qui assurerait une succession secondaire des maquis incendiés.

Par ailleurs, la coexistence des deux voies de multiplication (la multiplication végétative et la multiplication sexuée) au sein de la majorité de nos espèces et notamment chez celles évoluant sur maquis minier, maximise fortement la vigueur et la compétitivité de ces espèces sur ce milieu (Fenner et Thompson, 2005). En effet, elles vont pouvoir combiner les avantages des deux formes de reproduction. Ainsi, la multiplication végétative, nécessitant moins d'énergie comparée à la reproduction sexuée, va permettre un développement localisé important et assurer ainsi rapidement, le maintien et la pérennisation d'une population (Fenner et Thompson, 2005). En ce qui concerne la restauration écologique, ce caractère apporte un avantage indéniable dans le maintien des sols et la lutte contre l'érosion et les espèces. On

peut donc confirmer le caractère de bonnes candidates pour la revégétalisation des 23 espèces ayant la capacité de se multiplier par voie végétative ou susceptible de le faire.

La reproduction sexuée, de son coté, apporte un avantage certain à long terme concernant la conservation des espèces et de la biodiversité. Ainsi, elle va permettre à la plante de s'adapter à la pression de sélection importante du maquis minier (taux de nutriments faible, teneur élevé en métaux lourds, forte lixiviation des sols).

Un autre trait de vie important, des espèces étudiées, dans la compétitivité et la résistance aux conditions extrêmes du milieu, se trouve être le type de fruit. Le Tableau 6 révèle la présence de 31 fruits lignifiés secs (achène, follicule, capsule) contre 13 fruits à mésocarpe charnu (baie, drupe, poly-drupe). La prédominance du caractère lignifié des fruits au sein des espèces étudiées est étroitement lié au milieu sec austère (drainage important des sols, précipitations intermittentes voire grosse période de sécheresse, températures importantes) dans lequel elles évoluent. De plus, le milieu est souvent sujet au feu et notamment depuis l'arrivée de l'homme (McCoy et al., 1999 ; L'Huillier et al., 2010). Ainsi, la lignification des fruits permettrait une meilleure protection des semences vis-à-vis des températures élevées des maquis miniers en assurant une enceinte de stockage plus ou moins close. En effet, mis à part les achènes correspondants aux 4 espèces de Cyperaceae étudiées et la capsule de la Rhizophoraceae, l'ensemble des fruits lignifiés (gousses, capsules et follicules) sont déhiscents, les semences se développent ainsi à l'intérieur du fruit avant une libération lente de ces dernières une fois mature et ceci suite à différents signaux du milieu environnant (forte sécheresse, dommages sur les fruits, alternance de températures importantes ou passage de feu).

Certains fruits, comme celui de *Grevillea exul* spp. *exul*, pour lequel notre étude a été la plus complète, montre un aspect sérotineux faible. Ce qui confirme cet aspect de l'adaptation envers les températures importantes et le passage de feu. Un autre point qui oriente vers cette adaptation à la sécheresse et au feu est le tégument *sensu-stricto* important et lignifié retrouvé dans les semences d'*Alphitonia neocaledonia*. En effet, généralement, la protection physique des semences à fruit pulpeux est assurée soit par l'endocarpe, soit par le mésocarpe, les téguments étant généralement très fins (Black et al., 2006). Dans le cas d'*A. neocaledonica* la protection est doublée.

Tableau 6 : Interrelations entre le type de fruit, la taille des téguments et la dissémination potentielle.

	Fruit lignifié		**Fruit à mésocarpe pulpeux**	
	Tégument fin	**Tégument épais-moyen**	**Tégument fin**	**Tégument épais-moyen**
Anémochorie	18	3		
Zoochorie	1	7	1	11
Barochorie et hydrochorie	2	1		1

L'analyse du Tableau 6 montre également des interrelations entre plusieurs traits de vie tels, le type de fruit, la taille des téguments au sens large (tégument *stricto sensu* de la graine, endocarpe sclérifié…) et la dissémination potentielle des espèces étudiées. Il ressort de ce tableau que :

- indépendamment de la structure du fruit, 22 espèces (49%) ont des téguments fins dont 18 (82%) présentent des structures permettant leur dissémination par le vent. L'anémochorie, mode strictement présent dans les fruits lignifiés, est donc un trait de vie important au sein des espèces évoluant dans les maquis miniers. De plus, ce dernier est intimement lié à la taille des téguments au sens large.
- 3 espèces à tégument épais-moyen sont disséminées par anémochorie. Elles le sont du fait de la structure du fruit et non pas de celle du tégument *stricto-sensu*. Il s'agit là, de *Dodonaea viscosa*, *Acacia spirorbis* et *Costularia comosa*.
- 23 espèces (51%) ont des téguments épais-moyen ce qui représente autant que les espèces à téguments minces. Ces espèces à tégument important sont étroitement liées à la zoochorie, en effet, 18 (78%) espèces se disperse potentiellement par zoochorie.

L'analyse des données issues de ces trois traits de vie permet de mettre en avant deux stratégies écologiques importantes qui semblent avoir court chez les semences des espèces étudiées et principalement sur maquis minier :

- Stratégie 1 : une première stratégie lie le caractère lignifié des fruits, la faible taille des téguments au sens large et la dispersion par anémochorie. De nombreux auteurs ont rapporté une corrélation négative entre la compétitivité et la capacité de dispersion des espèces, ces deux traits de vie ont été relevés au sein des espèces ici étudiées, ce qui leur confèrent un avantage important dans la colonisation de niche écologique vide et dans l'occupation de milieu ouvert comme le maquis minier. La coexistence de ces deux traits de vie n'est pas un caractère typique des espèces étudiées puisqu'elle se retrouve aussi au sein d'espèces du genre *Typha spp.*, *Chamerion angustifolium*, *Phragmites australis* (Fenner et Thompson, 2005). La dispersion par anémochorie peut apporter un avantage certain dans un milieu ouvert et pauvre en nutriment (Fenner et Thompson, 2005) comme le maquis minier. En effet, dans un tel milieu, l'éloignement des semences de la plante mère permet de s'affranchir d'une compétition concernant l'allocation des ressources et ainsi, d'apporter un avantage supplémentaire au développement du nouvel individu.

- Stratégie 2 : la seconde stratégie lie la taille importante des téguments, le type de dispersion par zoochorie et en moindre importance, le caractère pulpeux des fruits. Le caractère des téguments épais *largo sensu* est aussi développé chez les espèces étudiées que le caractère des téguments fin *largo sensu*. Cette stratégie apporte un avantage indéniable dans le développement des espèces au sein du maquis minier. En effet, si l'on considère les semences à téguments épais *largo sensu*, dispersées ou pas par zoochorie, ce trait apporte un avantage dans la constitution des banques de graines du sol (voir plus bas). De plus, l'ingestion des semences à téguments épais par des animaux et notamment des oiseaux peut jouer un rôle dans la scarification des semences en fragilisant les téguments et faciliter ainsi la ré-implantation d'un nouvel individu (Leck et Schütz, 2005) par une levée de dormance physique.

Par ailleurs, l'analyse de ces deux stratégies ne peut être bien définie sans prendre en compte la masse des semences (Tableau 7). En effet, à part les 3 espèces de Proteaceae à plus de 1,2 g/100 graines, *Dodonaea viscosa* (0,37 g/100 graines), *Acacia spirorbis* (1,11 g/100 graines), les 16 autres espèces (soit 76% des espèces se disséminant par anémochorie) pèsent moins de 0,26 g/100 graines.

Tableau 7 : Caractéristiques externes des semences des espèces étudiées.

Famille	Genre/espèce	Mode de multiplication	Type de fruit	masse des semences (100 graines/g)	Tégument	Dissémination potentiel
Casuarinaceae	*Casuarina teres*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,1	Mince	Anémochorie (aile)
Casuarinaceae	*Gymnostoma chamaecyparis*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,26	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Acsmithia meridionalis*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,125 mg	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Cunonia deplanchei*	A(R) et S	Capsule déhiscent	0,034	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Cunonia macrophylla*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,048	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Geissois hirsuta*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,091	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Geissois magnifica*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,09	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Geissois montana*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,11	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Geissois pruinosa*	A(R)? et S	Capsule déhiscent	0,13	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Pancheria hirsuta*	A(R) et S	Capsule déhiscent	0,025	Mince	Anémochorie (aile)
Cunoniaceae	*Pancherai vieillardii*	A(R) et S	Capsule déhiscent	0,02	Mince	Anémochorie (aile)
Cyperaceae	*Baumea deplanchei*	S	Achene	0,27	Epais	Barochorie et hydrochorie
Cyperaceae	*Gahnia aspera*	A(R)? et S	Achene	1,09	Epais	Zoochorie (achene rouge)
Cyperaceae	*Schoenus neocaledonicus*	S	Achene	0,052	Mince	Anémochorie (plumulle)
Cyperaceae	*Costularia comosa*	S	Achene	0,019	Epais	Anémochorie (plumulle)
Elaeocarpaceae	*Elaecarpus kaalensis*	S	Drupe		Epais	Zoochorie (pulpe)
Euphorbiaceae	*Austrobuxus carunculatus*	S	Capsule déhiscent	0,59	Epais	Zoochorie (caroncule)
Euphorbiaceae	*Croton insularis*	A(R) et S	Capsule déhiscent	0,63	Mince	Barochorie et hydrochorie
Goodeniaceae	*Scaevola cylindrica*	A(R)? et S	Baie	3,33	Epais	Zoochorie (pulpe)
Goodeniaceae	*Scaevola montana*	A(R) et S	Baie	2,12	Epais	Zoochorie (pulpe)[a]
Guttifereae	*Montrouziera sphaeroidea*	A(R) et S	Baie	50,48	Epais	Zoochorie (pulpe)
Hippocrateaceae	*Dicarpellum baillonianum*	S	Capsule déhiscent	4,87	Mince	Barochorie et hydrochorie
Joinvilleaceae	*Joinvillea plicata ssp. plicata*	S	Poly-drupe	1,85	Epais	Zoochorie (pulpe)
Mimosaceae	*Seriantes sachetae*	A(R)? et S	Gousse lignifié	27,86	Epais	Barochorie et hydrochorie
Mimosaceae	*Acacia spirorbis*	A(R) et S	Gousse lignifié	1,11	Epais	Anémochorie et zoochorie
Myrsinaceae	*Rapanea minuta*	S	Drupe	1,12	Moyen	Zoochorie (pulpe)
Myrsinaceae	*Tapeinosperma sp.*	S	Drupe	10,44	Epais	Zoochorie (pulpe)
Myrtaceae	*Carpolepis laurifolia var. laurifolia*	S	Capsule déhiscent	0,011	Mince	Anémochorie (aile)
Myrtaceae	*Syzygium frutescens*	S	Drupe	4,83	Moyen	Zoochorie (pulpe)
Myrtaceae	*Xanthostemum sulfureus*	A(R)?	Capsule déhiscent	0,22	Moyen	Barochorie et hydrochorie
Myrtaceae	*Tristaniopsis guillainii var. guillainii*	A(R)?	Capsule déhiscent	0,24 mg	Mince	Anémochorie (aile)
Pittosporaceae	*Pittosporum simsonii*	S	Capsule déhiscent	1,6	Moyen	Barochorie et hydrochorie
Proteaceae	*Grevillea exul ssp. exul*	A(R) et S	Follicule	2,71	Mince	Anémochorie (aile)
Proteaceae	*Knightia deplanchei*	S	Follicule	0,029	Mince	Anémochorie (aile)
Proteaceae	*Stenocarpus milneii*	A(R) et S	Follicule	1,47	Mince	Anémochorie (excroissance ailée)
Proteaceae	*Stenocarpus umbelliferus*	A(R) et S	Follicule	1,25	Mince	Anémochorie (excroissance ailée)
Rhamnaceae	*Alphitonia neocaledonica*	S	Poly-drupe	2,32	Epais	barochorie et zoochorie (arille rouge vif)?
Rhizophoraceae	*Crossostylis grandiflora*	S	Capsule non déhiscent	0,45	Mince	Zoochorie (inflorescence vive)
Rubiaceae	*Pschotria baillonii*	S	Poly-drupe	11,29	Moyen	Zoochorie (pulpe)
Rubiaceae	*Pschotria douarrei*	S	Poly-drupe	10,14	Moyen	Zoochorie (pulpe)
Rubiaceae	*Pschotria oleoides*	S	Poly-drupe		Mince	Zoochorie (pulpe)
Rutaceae	*Geijera cauliflora*	S	Capsule déhiscent	5,18	Epais	Barochorie et hydrochorie
Rutaceae	*Melicope lasioneura*	S	Capsule déhiscent étoilé	4,93	Epais	Barochorie et hydrochorie
Sapindaceae	*Dodonea viscosa*	S	Capsule déhiscent	0,37	Epais	Anémochorie (Capsule ailée)
Winteraceae	*Zygogynum pancheri var. pancheri*	S	Baie	1,12	Moyen	Zoochorie (pulpe) [a]

Les semences de *Scaevola montana* sont disséminées par deux oiseaux, le *Columba vitiensis* ssp. *hypoenochroa* (Collier blanc) et le *Zosterops xanthochroa* (*Zosterops* à dos vert) (Wulff, *comm. pers.*). A et S définissent les deux types de reproduction observés, A : asexuée ; S : sexuée. R : Rejet. Un terme suivi de ? signifie que ce dernier est un caractère potentiel de l'espèce considérée.

Il est connu que les traits de vie concernant la capacité à la dispersion par le vent et la taille des semences, ici, définie par la masse de ces dernières, sont étroitement liés. Ainsi plus une semence est petite et plus la capacité à se disperser par le vent est grande (Fenner et Thompson, 2005).

En ce qui concerne, les semences des espèces de Proteaceae, et plus particulièrement *Grevillea exul* spp. *exul*, la masse de ces dernières dépasse largement la masse des autres espèces anémochores, cependant, elle reste l'une des plus faibles connues chez les espèces du genre *Grevillea* et plus largement, des Proteaceae du monde. De plus, leurs formes aplaties avantagent sans aucun doute leur dissémination par le vent. Pour ce qui est de *Dodonaea viscosa* et d'*Acacia spirorbis*, le fait qu'elles ne suivent pas la tendance des autres espèces développant l'anémochorie peut s'expliquer par le fait que le caractère de dispersion par le vent est assuré par le fruit et non par la semence en elle-même.

La taille des semences est un caractère très peu variable chez les plantes (Marshall et al., 1986), cependant elle présente un degré considérable de plasticité phénotypique en réponse aux conditions du milieu (Fenner et Thompson, 2005). Ainsi, les conditions environnementales du maquis minier privilégieraient des tailles faibles de semence et notamment concernant *Grevillea exul* spp. *exul* et probablement pour les espèces développant la même stratégie.

Si l'on considère les espèces de la stratégie 2, sur les 20 espèces développant un tégument épais-moyen et non anémochore, 12 espèces (60%) ont une masse supérieure à 2 g. De plus, deux études spécifiques menées sur *Alphitonia neocaledonica* et sur *Gahnia aspera*, qui ont fait l'objet de publications, ont montré que les graines de ces deux espèces ont des tailles importantes (relativement à leur masse). En effet, les semences de ces deux espèces ont des valeurs de poids et de taille déterminées comme étant parmi les plus importantes au sein de leurs genres respectifs.

Ainsi, à *contrario* de *Grevillea exul* spp. *exul,* les conditions environnementales conditionneraient des tailles de semence importantes pour ces deux espèces et probablement pour les espèces développant la même stratégie.

Aussi, on peut penser qu'au sein des espèces étudiées, les facteurs environnementaux ont conditionné la taille des semences la plus propice afin de maximiser les chances de développement d'une espèce. En effet, conditionner des tailles de semence importantes comme pour les espèces de la stratégie 2, apporte un avantage conséquent dans la formation de banque de graines du sol. De nombreux auteurs ont reporté de fortes corrélations positives entre les petites tailles des semences et la persistance de ces dernières dans les banques de graines du sol (Fenner et Thompson, 2005). Cependant, Leishman et Westoby (1998) a *contrario* n'ont noté aucune relation entre la taille des semences et la persistance de ces dernières dans les banques de graine du sol en Australie. Par contre, ils ont pu établir une corrélation positive forte entre la persistance des semences dans les banques de graine du sol, la dureté et la taille importante des téguments liées inexorablement à la dormance physique des semences. Cela confirme nos résultats concernant les semences de la stratégie 2 (en particulier *A. neocaledonica* et *Gahnia aspera* qui détiendraient donc une forte capacité de persistance dans les banques de graines du sol. Cet aspect des semences du maquis minier confirme la nécessité et l'importance de la réutilisation, quand il est possible, du topsoil présent sur les maquis.

Si l'on s'attache maintenant à l'analyse de la structure interne des semences (Tableau 8), elle montre qu'il y a 7 graines exalbuminées (15%) (*Casuarina teres*, *Gymnostoma chamaecyparis*, *Grevillea exul* ssp. *exul*, *Knightia deplanchei*, *Stenocarpus milneii*, *Stenocarpus umbelliferus* et *Dononaea viscosa*) contre 38 semences albuminées (85%). Sur ces 7 graines exalbuminées, 6 (86%) ont des téguments fins et sont anémochores, elles appartiennent donc aux espèces de la stratégie 1 définies plus haut. De part leurs caractères exalbuminées, la proportion de l'embryon au sein de la semence est importante. Parmi ces 6 espèces, 2 ont pu être définies comme étant non dormantes au cours de cette étude et 3 non dormantes par L'Huillier et al. (2010).

La 7ème espèce exalbuminée *Dodonaea viscosa* est la seule qui a un tégument épais et certains auteurs ont défini sa dormance comme étant une dormance physique (Baskin et Baskin, 2004 ; L'Huillier, 2010). Plusieurs auteurs ont longuement étudié la morphologie des embryons (Martin, 1946 ; Baskin et Baskin, 1998 ; Nikolaeva, 1999, Forbis et al., 2002) et tous s'accordent à définir les embryons sous développés comme étant un caractère primitif et les embryons matures comme étant un caractère avancé.

Tableau 8 : Caractéristiques internes structurales des semences étudiées

Famille	Genre/Espèce	Tégument	Albuminée ou Exalbuminée	Embryon	Tolérance au Nickel	Dormance
Casuarinaceae	*Casuarina teres*	Mince	Exalbuminée	Important	Tolérante	ND?
Casuarinaceae	*Gymnostoma chamaecyparis*	Mince	Exalbuminée	Important	Tolérante	ND[1]
Cunoniaceae	*Acsmithia meridionalis*	Mince	Albuminée		Tolérante	ND
Cunoniaceae	*Cunonia deplanchei*	Mince	Albuminée	Un tiers?	Tolérante	ND
Cunoniaceae	*Cunonia macrophylla*	Mince	Albuminée	Un tiers	Tolérante	PD (Seed coat)?[2]
Cunoniaceae	*Geissois hirsuta*	Mince	Albuminée	Un tiers	Accumulateur	PD (Seed coat)?
Cunoniaceae	*Geissois magnifica*	Mince	Albuminée	Un tiers	Accumulateur	PD (Seed coat)?
Cunoniaceae	*Geissois montana*	Mince	Albuminée	Un tiers	Accumulateur	PD (Seed coat)?
Cunoniaceae	*Geissois pruinosa*	Mince	Albuminée	Un tiers	Hyperaccumulateur	PD (Seed coat)?[2]
Cunoniaceae	*Pancheria hirsuta*	Mince	Albuminée	Un quart	Tolérante	ND
Cunoniaceae	*Pancherai vieillardii*	Mince	Albuminée	Un quart	Tolérante	ND
Cyperaceae	*Baumea deplanchei*	Epais	Albuminée	Peu important	Tolérante	PY + PD?
Cyperaceae	*Gahnia aspera*	Epais	Albuminée	Moyen (30%)[a]	Tolérante	PD (Seed coat)
Cyperaceae	*Schoenus neocaledonicus*	Mince	Albuminée	Un quart	Tolérante	ND[1]
Cyperaceae	*Costularia comosa*	Epais	Albuminée	Un quart	Tolérante	ND[1]
Elaeocarpaceae	*Elaecarpus kaalensis*	Epais	Albuminée	Un quart	-	-
Euphorbiaceae	*Austrobuxus carunculatus*	Epais	Albuminée	Un tiers	Tolérante	-
Euphorbiaceae	*Croton insularis*	Mince	Albuminée	Un quart	Tolérante	-
Goodeniaceae	*Scaevola cylindrica*	Epais	Albuminée	Important	Tolérante?	PY?[1]
Goodeniaceae	*Scaevola montana*	Epais	Albuminée	Important	-	PY?[1]
Guttifereae	*Montrouziera sphaeroidea*	Epais	Albuminée	Important	-	-
Hippocrateaceae	*Dicarpellum baillonianum*	Mince	Albuminée	Un quart	-	-
Joinvilleaceae	*Joinvillea plicata ssp. plicata*	Epais	Albuminée	Peu important	-	MPD?[1]
Mimosaceae	*Seriantes sachetae*	Epais	Albuminée	Un quart	Tolérante	PY
Mimosaceae	*Acacia spirorbis*	Epais	Albuminée	Important	Tolérante	PY[1]
Myrsinaceae	*Rapanea minuta*	Moyen	Albuminée	Important	-	-
Myrsinaceae	*Tapeinosperma sp.*	Epais	Albuminée	Un quart	-	-
Myrtaceae	*Carpolepis laurifolia var. laurifolia*	Mince	Albuminée	Important	Tolérante	ND
Myrtaceae	*Syzygium frutescens*	Moyen	Albuminée	Peu important	Tolérante	
Myrtaceae	*Tristaniopsis guillainii var. guillainii*	Mince	Albuminée	Important	Tolérante	ND[1]
Myrtaceae	*Xanthostemum sulfureus*	Moyen	-	-	Tolérante	-
Pittosporaceae	*Pittosporum simsonii*	Moyen	Albuminée	Peu important	-	-
Proteaceae	*Grevillea exul ssp. exul*	Mince	Exalbuminée	Important(54%)	Tolérante	ND
Proteaceae	*Knightia deplanchei*	Mince	Exalbuminée	Important	Tolérante	-
Proteaceae	*Stenocarpus milneii*	Mince	Exalbuminée	Important	Tolérante	ND
Proteaceae	*Stenocarpus umbelliferus*	Mince	Exalbuminée	Important	Tolérante	ND[1]
Rhamnaceae	*Alphitonia neocaledonica*	Epais	Albuminée	Important(80%)	-	PY + PD?
Rhizophoraceae	*Crossostylis grandiflora*	Mince	Albuminée	Un quart	-	-
Rubiaceae	*Pschotria baillonii*	Moyen	Albuminée	Peu important(10%)	Accumulateur	PD (Seed coat)?
Rubiaceae	*Pschotria douarrei*	Moyen	Albuminée	Peu important(18%)	Hyperaccumulateur	PD (Seed coat)?
Rubiaceae	*Pschotria oleoides*	Mince	Albuminée	Peu important	Tolérante	-
Rutaceae	*Geijera cauliflora*	Epais	Albuminée	Important	-	PY+PD?
Rutaceae	*Melicope lasioneura*	Epais	Albuminée	Important	-	-
Sapindaceae	*Dodonea viscosa*	Epais	Exalbuminée	Important	Tolérante	PY[1]
Winteraceae	*Zygogynum pancheri var. pancheri*	Moyen	Albuminée	Très petit	-	MD?

[a]les valeurs entre parenthèses correspondent au ratio Embryon/Semence, les données suivies de ? signifient que ces dernières sont hypothétiques, ND : Non dormante, PD : dormance physique, PY : dormance physiologique, MPD : Dormance morpho-physiologique ; [1]d'après L'Huillier et al., 2010 ; [2]d'après Fogliani et al., 2004.

Les 7 espèces intégrant la stratégie 1 seraient alors avancées d'un point de vue phylogénétique. En effet, Forbis et al. (2002) classe les Casuarinaceae et les Sapindaceae dans le clade avancé des Rosids. Par contre, Forbis et al. ont classé les Proteaceae dans une autre lignée du clade des eudicots. Ainsi, la taille de l'embryon aurait évolué indépendamment dans une autre lignée d'eudicot. Forbis et al. reportent aussi que, le fait que les embryons larges peuvent évoluer séparément ou indépendamment dans plusieurs lignées, serait une preuve qu'une semence portant un embryon mature et développé soit une adaptation. Ainsi, les embryons de taille importante retrouvés au sein des sept espèces citées plus haut pourraient être la conséquence d'une adaptation.

L'analyse des données concernant les semences albuminées montre que les semences à embryon volumineux (Tableau 9) sont plus importantes. En effet, on observe 25 espèces à embryon large (59%) et 17 espèces à petits embryons (41%) dont une espèce possède un embryon de très faible taille (*Zygogynum pancheri* var. *pancheri*). La mise en exergue de la répartition des espèces à embryon large dans les deux types d'habitat (Tableau 9) montre une prédominance de ces derniers dans le maquis minier. En effet, 88% des espèces à embryon large se retrouve dans le maquis minier contre seulement 12% qui évolue en forêt humide, de plus, si l'on focalise sur les espèces se développant sur le maquis, 22 espèces (65%) contre 12 (35%) espèces produisent des semences à embryon large. Le caractère important des embryons pourrait alors être une adaptation des semences au maquis minier.

Tableau 9 : Relation entre la taille de l'embryon (ration embryon/graine) et le type d'habitat des espèces.

		Embryon	
		Très petit/ Un quart ou moins	Important/ Un tiers ou plus
Habitat	Forêt humide	5	3
	Maquis	12	22

Toutefois, il serait utile de préciser et de confirmer ses conclusions via une étude plus complète qui rassemblerait un échantillonnage plus important en semences d'espèces de forêt humide. Il serait aussi utile de cibler les conditions environnementales du maquis qui seraient à l'origine de cette adaptation (déficit hydrique, température élevée, présence de métaux lourds toxique).

La morphologie des embryons étant liée par ailleurs au type de dormance développé par les semences (Forbis et al., 2002 ; Baskin et Baskin, 2004 ; Black et al., 2006), il n'est pas surprenant de retrouver principalement des dormances physiques (3 espèces + 2 espèces potentielles), physiologiques (induite par les téguments *largo sensu*) (1 espèce et 7 potentielles), l'association des deux (3 espèces potentielles) ainsi que des semences non dormantes (10 espèces + 3 espèces potentielles). La très petite taille des embryons de *Zygogynum pancheri* ssp. *pancheri* sous-tend à lui attribuer une dormance morphologique, en effet ce dernier est classé très bas dans l'arbre phylogénétique construite par Forbis et al. (2002) à partir des données du rapport Embryon/Graine. Il en est de même pour *Joinvillea plicata* spp. *plicata* (L'Huillier et al., 2010).

Si l'on considère, les deux types de stratégies des semences définis précédemment, les semences non dormantes sont tributaires de la stratégie 1 et les semences développant une dormance physique ou physiologiques (induite par les téguments *sensu largo*) sont proche de la stratégie 2.

Ainsi, pour la stratégie 1, si l'on prend en compte la faculté des semences à la dispersion anémochore, tenant compte des téguments minces et par voie de conséquence, une faible longévité *in situ*, il semble avantageux à ce que la semence germe peu de temps après sa dispersion afin de maximiser au mieux les chances de reprise.

Pour ce qui est des semences de la stratégie 2, le tégument épais joue un rôle charnière dans les traits de vie de ces dernières. En effet, les téguments de ces semences vont induire des dormances (Tableau 8) qui vont leur permettre de retarder la germination et de rentrer en vie latente jusqu'à la réunion des conditions optimales de germination (quantité suffisante d'eau, oxygénation satisfaisante, température optimale…). Cet aspect confirme le trait de vie concernant la capacité importante des semences de la stratégie 2 de persister dans le topsoil et de former ainsi la banque de graines du sol (Leishman et Westoby, 1998).

La tolérance au nickel a aussi été reporté dans le Tableau 8. Ces données concernant ce trait de vie ont été complétées à partir des travaux de thèse de Jaffré (1980). Le premier point remarquable est la fréquence importante du caractère de tolérance au Ni développé par les plantes étudiées indépendamment du type d'habitat. En effet, que ce soit sur maquis minier ou en forêt humide, les sols abritant ces espèces sont tous issus de roches ultramafiques et par définition, tous enrichis en Ni. Le caractère de tolérance au Ni a été attribué à 26 (81%) espèces sur les 32 étudiées au niveau de ce trait de vie. Le caractère accumulateur (12%) a été reporté sur 4 espèces et le caractère hyperaccumulateur sur 2

espèces (7%). Il est important de noter la répartition originale des caractères accumulateur et hyperaccumulateur puisqu'ils sont présent essentiellement au niveau de deux familles étudiées (les Cunoniaceae, et les Rubiaceae). Jaffré (1980) avait noté, en se basant sur la classification des familles de Sporne (1969), le caractère archaïque des familles développant ces caractères d'accumulation et d'hyperaccumulation du Ni ; il reporte que ces derniers pourraient être d'acquisition très ancienne et considérés eux-mêmes comme des caractères archaïques. Toutefois, en se basant sur la même classification de Sporne (1969), l'occurrence de ces deux caractères au sein de la famille des Rubiaceae (indice de 70) considérée comme évoluée ainsi qu'au sein de quelques lignées indépendantes du clade des asterids (Oncothecaceae, Escalloniaceae, Sapotaceae) montre que le caractère d'accumulation et d'hyperaccumulation du Ni serait plus une adaptation aux conditions du milieu (Forbis et al., 2002).

L'analyse du taux d'humidité des semences (Tableau 10) montre que 15 espèces sur les 24 étudiées (62,5%) ont un taux d'humidité faible (inférieure à 10%) ce qui suggère leur caractère orthodoxe. Les 9 autres espèces contiennent entre 10 et 15% d'eau dont une à 16,84% d'eau, ce qui suggère que les semences sont soit orthodoxes vraies, soit intermédiaires. Aucune semence récalcitrante n'a été reportée au sein des espèces étudiées. Ainsi, le caractère orthodoxe des semences semble être prédominant. Si l'on considère le trait de vie du type d'habitat, on peut noter que sur les 9 espèces contenant entre 10 et 15% en eau des semences, 3 espèces évoluent en forêt humide ou en lisière de forêt et les 21 espèces restantes évoluent dans le maquis minier. En effet, la plupart du temps, les semences orthodoxes tendent à acquérir une tolérance au desséchement et une longévité importante au moment de leur dispersion naturelle (Black et al., 2006). Ainsi, les semences du maquis minier vont pouvoir du fait de leur orthodoxie s'adapter aux conditions extrêmes ayant cours au niveau du maquis (températures, déficit hydrique…) et assurer une vie ralentie durant les mauvaises périodes dans l'attente de conditions favorables à leur développement (Côme et Corbineau, 2006). Ces différents avantages peuvent être aisément liés aux semences de la stratégie 2 définissant des semences à persistance importante au niveau des banques de graines du sol après leur dispersion et à dormances physique et/ou physiologique (induite par les téguments *largo sensu*).

Tableau 10 : Composition biochimique et taux d'hydratation des semences des espèces étudiées.

Famille	Genre/Espèce	Taux d'humidité (%)	Protéines totales (%)	Lipides neutres (%)	Glucides hydrosolubles (%)	Amidon (%)
Casuarinaceae	*Casuarina teres*	11,54	9,72	21,04	0,44	-
Casuarinaceae	*Gymnostoma chamaecyparis*	8,54	5,19	14,76	15,1	-
Cunoniaceae	*Cunonia macrophylla*	9,16	3,87	37,65	3,36	-
Cunoniaceae	*Geissois pruinosa*	7,91	13,66	33,76	2,18	-
Cyperaceae	*Baumea deplanchei*	8,36	15,36	16,65	1,95	-
Cyperaceae	*Gahnia aspera*	7,29	14,63	17,77	3,59	8,92
Cyperaceae	*Costularia comosa*	8,31	7,99	58,73	3,86	-
Euphorbiaceae	*Austrobuxus carunculatus*	5,32	14,59	46,35	7,45	-
Goodeniaceae	*Scaevola cylindrica*	11,85	9,46	11,41	15,31	-
Goodeniaceae	*Scaevola montana*	11,82	21,16	8,55	10,95	-
Joinvilleaceae	*Joinvillea plicata ssp. Plicata*	9,01	25,85	12,03	2,31	-
Mimosaceae	*Acacia spirorbis*	7,73	15,97	25,1	12,5	-
Myrtaceae	*Carpolepis laurifolia var. laurifolia*	16,84	46,61	5,28	18,4	-
Myrtaceae	*Tristaniopsis guillainii var. guillainii*	8,77	19,48	39,02	2,85	-
pittosporaceae	*Pittosporum simsonii*	10,71	25,69	17,66	2,18	-
Proteaceae	*Grevillea exul ssp. exul*	8,75	19,28	25,56	3,29	-
Proteaceae	*Stenocarpus milneii*	8,21	20	19,81	6,16	-
Proteaceae	*Stenocarpus umbelliferus*	7,83	-	-	-	-
Rhamnaceae	*Alphitonia neocaledonica*	8,89	15,5	11,73	1,36	0,14
Rhizophoraceae	*Crossostylis grandiflora*	7,98	19,08	28,9	2,58	-
Rubiaceae	*Pschotria baillonii*	11	1,31	-	-	-
Rubiaceae	*Pschotria douarrei*	15,5	7,63	14,88	5,22	0,37
Rutaceae	*Geijera cauliflora*	13,65	12,34	22,68	1,11	-
Sapindaceae	*Dodonaea viscosa*	11,36	5,26	15,47	3,2	-

Sur les 24 espèces étudiées ci-dessus, l'analyse de la composition biochimique des réserves séminales n'a pu être menée que sur 22 espèces. Cependant, les données qui en résultent sont extrêmement intéressantes. On a pu établir la répartition des espèces selon le type de réserve séminale majoritaire (semence oléagineuse, amylacée ou protéagineuse). Les résultats ont permis de mettre en évidence la prédominance des semences oléagineuses au sein du maquis minier, avec 14 semences (64%) riches en lipides, 6 semences (27%) protéagineuses et seulement 2 (9%) de type amylacé. Il est aussi intéressant de noter la corrélation positive importante entre la fraction lipidique et la fraction protéique. En effet, pour toutes les semences oléagineuses, la seconde plus importante réserve est la fraction protéique. En fait, l'association Lipide-Protéine en terme d'importance au niveau des réserves séminales représente 82% des 22 espèces, c'est-à-dire 18 espèces contre 2 espèces développant l'association Protéine-Glucide et les 2 dernières développant l'association Lipide-Glucide. L'importance de l'association des réserves séminales Lipide-Protéine n'est pas propre aux semences du maquis minier néo-calédoniens, en effet, cette caractéristique se

retrouve souvent chez les semences oléagineuses (Barclay et Earle, 1974 ; Black et al., 2006 ; Côme et Corbineau, 2006).

Lorsque l'on considère la teneur en eau des semences, il est aisé de distinguer une corrélation négative entre une quantité importante de lipides et un taux d'humidité faible des semences. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Mc Gill et al. (2002). En effet, ces derniers reportent que les semences d'espèces à teneur importante en huile sont caractérisées par une faible teneur en eau. La teneur en lipide de toutes les semences est donc importante dans la détermination du potentiel de stockage et des conditions optimums.

Par ailleurs , les résultats montrent une relation étroite entre des teneurs importantes en lipides et la dispersion par le vent, en effet les lipides produisent deux fois plus d'énergie que les carbohydrates pour une même masse, les semences ont donc une taille moitié moins importante pour une même vigueur en terme d'énergie (Fenner et Thompson, 2005), ce qui avantage plus encore la dissémination par le vent et qui explique ainsi en partie l'importance des espèces de la stratégie 1 dans le maquis minier. De plus, indépendamment du type de semence (stratégie 1 ou stratégie 2), cette importante quantité d'énergie est un avantage certain pour les semences du maquis minier car elle va faciliter le développement des nouvelles plantules en particulier sur les terrains ultramafiques où les déficits en eau et en nutriments sont important.

La mise en place des réserves et notamment des réserves lipidiques n'est pas sans coût en énergie pour les plantes. Ces dernières allouent et répartissent leurs ressources prioritairement à la reproduction et à la formation des semences. Ces espèces vont donc compenser cette perte en énergie en diminuant les ressources allouées aux autres fonctions importantes d'une plante à savoir le maintien, la croissance et la défense (Fenner et Thompson, 2005 ; Gupta et al., 2000). Pour ce qui est des espèces du maquis minier, la croissance des plantes est extrêmement faible et ainsi, consomme très peu d'énergie. Ce caractère pourrait être lié aux faibles teneurs en nutriments dans les sols et à la quantité importante de métaux lourds toxiques et notamment le nickel. Cependant, Jaffré (1980) a montré que la croissance lente de certaines plantes issues du maquis minier n'était pas dépendante du type de sol.

Dans la même optique, Lokesha et al. (1992) a noté une corrélation importante entre le taux élevé en lipides des semences et la faculté à se disperser par le vent, il a même émis une prévision des teneurs en lipide en reportant des teneurs proche de 25% pour des semences anémochores et des teneurs proches de 10% en lipides pour des semences se dispersant autrement que par le vent. Ainsi, concernant nos espèces, sur les 22 espèces dont la teneur en lipide a été déterminée, 11 espèces sont anémochores. On pourrait s'attendre selon Lokesha et al. (1992) à ce qu'elles aient des teneurs en lipides proche de 25%. Or 4 d'entre-elles présentent des valeurs lipidiques inférieures, 3 ayant des valeurs supérieures à 14% et une détenant un taux de lipide proche de 5%. Sur les 7 espèces ayant une teneur en lipide égale ou supérieure à 25%, 3 espèces ont leur valeur proche de 25% et 4 espèces ont des valeurs supérieures à 30% en lipide. Concernant les 11 espèces développant une dispersion autre que par anémochorie, 4 espèces ont des teneurs proches de 10% et 7 des teneurs lipidiques supérieures à 15%. Ainsi, bien que la corrélation émise par Lokesha et al., (1992) semble se vérifier en partie en ce qui concerne nos semences, elle ne suffit pas à expliquer entièrement les variations que l'on peut observer et notamment nos quantités importantes de réserves lipidiques aussi bien chez les semences anémochores que chez les semences développant d'autres types de dispersion.

Aussi, Thompson et al. (2002) dans un même type d'étude mais en prenant en compte cette fois le lien avec la phylogénie des espèces, n'a noté aucune corrélation entre ces deux caractères. Il explique ce manque de corrélation soit par un échantillonnage insuffisant, soit par l'existence d'autres forces de sélection influant la composition chimique des semences. Nos résultats apportent ainsi un éclairage sur cette interrelation dans le fait que les ressources disponibles à la plante mère semblent fortement interagir également dans la composition des réserves séminales des espèces en général.

Les acides gras constitutifs des lipides neutres ont été identifiés à plus de 80% pour 12 espèces sur les 13 étudiées. En effet, les acides gras de *Dodonaea viscosa* n'ont pu être identifiés qu'à hauteur de 35%, un pic représentant 60% du total des acides gras n'a pas pu être identifié et l'analyse de ce dernier est en cours. L'analyse des acides gras de la fraction lipidique de quelques espèces étudiées précédemment montre une prédominance des acides gras insaturés et notamment, de l'acide oléique et de l'acide linoléique. En effet, les ratios des acides gras insaturés sur saturés sont tous supérieur à 1 (données non reportées). Le ratio est même très supérieur à 1 pour 12 des 13 espèces étudiées (Tableau 11). La seule espèce présentant un ratio proche de 1 est *Dodonea viscosa* dont l'ensemble des acides gras n'a pu

être identifié qu'à hauteur de 35%, ce qui pourrait expliquer son faible ratio. Ces valeurs élevées de ratio (>3) sont proches de ce que l'on peut retrouver chez des semences de milieu tempéré (Connor et al., 2007). Ce trait de caractère contraste avec les tendances générales émises par certains auteurs (Mc Nair, 1929 ; Hilditch et al., 1951) qui ont reporté que les semences de plantes tropicales avaient tendance à être constituées majoritairement d'acides gras saturés. Ces estimations résultent probablement de l'importance de la répartition des forêts denses humides au niveau des tropiques. Dans le cas du maquis minier néo-calédonien, les conditions environnementales se rapprochent sensiblement des conditions de milieu tempéré. En effet, durant les périodes de remplissage des semences, les températures avoisinent 10 à 15°C. De plus, les sols des maquis miniers étant très fortement drainés, la disponibilité en eau est peu importante.

Tableau 11 : Composition en acide gras de 13 espèces du maquis minier.

Nom commun (Nombre de carbone et insaturation)	Acide gras (% du total des acides gras) des réserves lipidiques												
	Bd	*Sc*	*Gc*	*Tg*	*Cl*	*Gp*	*Cm*	*Ac*	*An*	*Ger*	*Gee*	*Dv*	*As*
Caprilic (C8:0)	0,7												
Capric (C10:0)	5,4							0,3					
Lauric (C12:0)								3,7					
Myristic (C14:0)	0,1							2,3	0,1				
Myristoleic (C14:1Δ9) (ω5)									0,2	8,5	1,3		
Palmitic (C16:0)	7,0	8,3	6,3	6,3	8,7	14,6	11,8	15,5	10,0	1,4	0,8	9,1	14,4
Palmitoleic (C16:1Δ9)	0,5		0,1			0,3	0,3	3,4	0,3		0,2		1,1
cis-11-Hexadecanoic (C16:1Δ11) (ω5)									10,7	45,6	20,8		
Margaric (C17:0)			0,1										
(C17:1Δ10)											0,2		
Stearic (C18:0)	2,7	3,8	5,7	7,6	3,2	3,9	3,4	3,3	4,2	0,8	1,3	2,8	1,5
Oleic (C18:1Δ9)	59,6	26,6	10,4	20,3	10,0	16,5	15,0	46,9	12,7	20,9	30,1	16,5	26,7
Vaccenic (C18:1Δ11)	1,6	0,9	0,7			1,4	2,1		1,2				2,1
Cis-13-Octadecanoic (C18:1Δ13) (ω5)									10,5	9,3	9,6		
Linoleic (C18:2Δ9,12) (LA)	11,9	57,5	74,7	59,4	70,5	62,1	65,2	19,8	23,6	2,1	1,1		47,2
α-Linolenic (C18:3Δ9,12,15) (ALA)		1,8	0,7	0,2	1,3	0,6	0,4	0,3	20,4	0,7		0,4	0,2
γ-Linolenic (C18:3Δ6,9,12)												1,4	
Arachidic (C20:0)	0,5	0,2	0,5	0,6	1,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	3,0	0,5
Cis-9-Eicosanoic (C20:1Δ9)			0,1						0,2				
Eicosenoic(C20:1Δ11)	1,0			2,9	0,2	0,1	0,1	0,1			1,3		0,3
Cis-15-Eicosanoic (C20:1Δ15) (ω5)									0,2		1,9		
Cis, cis-11, 14-Eicosadienoic (C20:2Δ11,14)	0,1												0,1
Arachidonic (C20:4n6Δ5, 8, 11, 14)													0,1
Heneicosanoic (C21:0)			0,1										
Behenic (C22:0)	0,2	0,1	0,3		1,2	0,1	0,1	0,1	0,7	1,4	1,0	1,7	2,3
Erucic (C22:1Δ13)											0,5		
(C22:1Δ17) (ω5)											2,1		
Lignoceric (C24:0)	0,1	0,1				0,1		0,2	0,4	1,8	1,9	0,3	
Nervonic (C24:1Δ15)		0,1									1,0		0,1
(C24:1Δ19) (ω5)											4,4		
Ratio insaturés/saturés	4,5	6,9	6,6	5,7	5,7	4,3	5,3	2,8	5,1	15,0	12,9	1,1	4,2
Total des acides gras identifiés	**91,2**	**99,4**	**99,8**	**97,2**	**96,3**	**99,9**	**98,7**	**96,1**	**95,7**	**92,9**	**80,1**	**35,1**	**96,5**

Bd (*Baumea deplanchei*), *Sc* (*Scaevola cylindrica*), *Gc* (*Gymnostoma chamaecyparis*), *Tg* (*Tristaniopsi guillainii var. guillainii*), *Cl* (*Carpolepis laurifolia var. laurifolia*), *Gp* (*Geissois pruinosa*), *Cm* (*Cunonia macrophylla*), *Ac* (*Austrobuxus carunculatus*), *An* (*Alphitonia neocaledonica*), *Ger* (*Grevillea exul ssp. rubiginosa*), *Gee* (*Grevillea exul ssp. exul*), *Dv* (*Dodonea viscosa*), *As* (*Acacia spirorbis*).

La part des acides gras insaturés dans le total des acides gras de chaque semence est très importante, mise à part *Dodonaea viscosa*, elle représente plus de 70% du total des acides gras pour chaque semence étudiée. Il est important de mettre en avant cet aspect puisqu'il peut être critique concernant la conservation et le stockage des semences. En effet, le taux important d'insaturation pourrait conduire dans de mauvaises conditions de stockage à des phénomènes d'auto-oxydation qui induiraient la formation de dérivé hydroxylés et généreraient ainsi du stress oxydatif. Ce phénomène peut être amplifié en produisant des superoxides ou d'autres ROS (Reactive oxygen species) qui initierait des dégradations peroxidatives importantes au niveau des tissus lipidiques (Bailly et al., 2004). Ces derniers ont notamment été reportés comme participant à la dégradation des membranes cellulaires (Pammenter et al., 1974). Il apparait donc important de suivre strictement les protocoles mis en place afin d'assurer au mieux le stockage et la conservation de ces semences. Notre courte étude sur les semences de *Gahnia aspera* (voir plus haut) en est une preuve flagrante.

Comme indiqué plus haut, la composition en acide gras est intimement liée, au moins en partie, aux conditions environnementales. Gupta et al. (2002) a pu montrer l'existence sur des semences de *Brassica juncea* (hyperaccumulateur de nickel) d'une relation entre la teneur en nickel et l'occurrence de différents acides gras. Ainsi, il note qu'une application croissante de chlorure de nickel allant de 5 à 40 ppm dans le sol entraine une diminution du taux d'acide érucique et une augmentation de l'acide linolénique (C18 :3Δ9, 12, 15) et de l'acide palmitique (C16 :0). En tenant compte des teneurs importantes en nickel du sol des maquis minier, nos résultats semblent être en accord avec les siens. En effet, aucune de nos semences ne montre la présence d'acide érucique et enfin, les teneurs importantes en acide gras insaturés de nos semences pourraient être liées aux quantités importantes en nickel dans les sols des maquis miniers.

Enfin un dernier aspect intéressant de l'étude de la composition en acide gras des semences du maquis minier est l'occurrence d'une série d'acide gras de type ω5 retrouvée chez *Alphitonia neocaledonica* et chez les deux espèces du genre *Grevillea*. Cet aspect ayant été analysé largement et ayant fait l'objet d'une publication intégré dans ce manuscrit. J'invite donc le lecteur à se référer à ces dernières.

IV/ Conclusion

L'étude biologique des semences des 45 espèces se développant principalement sur maquis minier a permis de mettre en évidence plusieurs stratégies écologiques de développement intégrant plusieurs traits de vie. Ces dernières, et plus particulièrement les traits de vie qui les caractérisent, affichent des caractères forts qui leur permettent de résister et de s'adapter aux contraintes ultramafiques. Un trait de vie ou un caractère fort pris seul est, la plupart du temps, insuffisant pour induire une forte compétitivité et pour assurer le maintien d'une espèce sur ce milieu. Il faut la conjugaison de plusieurs caractères forts pour assurer un développement minimal sur les maquis minier. Ces caractères sont fortement liés et sont définis comme étant des stratégies mises en place par les semences d'espèces du maquis minier.

Dans notre étude, nous avons pu définir deux types de stratégies à partir de caractères forts et d'interrelations entre ces caractères développés par les semences du maquis minier. Cependant, il serait réducteur de restreindre l'écologie des semences du maquis minier en deux stratégies. En effet, la très grande variabilité spécifique et la variabilité génétique ainsi que l'occurrence de plusieurs types d'habitats et de climats ayant cours sur les sols issus de roches ultramafiques, laissent supposer l'existence de plusieurs autres stratégies et interrelations mineures. Les deux stratégies définies dans nos travaux et dénommées stratégie 1 et stratégie 2 représentent les deux tendances écologiques prépondérantes concernant les semences d'espèces du maquis minier que nous avons pu déterminer.

Certains auteurs ont déjà pu noter l'existence de stratégies similaires ou du moins proche de ce que l'on a pu observer (Fenner et Thompson, 2005). Ces stratégies ont été dénommées « effectively dispersed » et « non effectively dispersed » et ressemblent en de nombreux points aux stratégies que nous avons pu définir. Cependant, les stratégies ayant cours dans le maquis minier néo-calédoniens diffèrent quelque peu des stratégies citées plus haut du fait de caractères adaptés aux conditions environnementales des maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie.

Ainsi, la stratégie 1 rassemble le caractère lignifié des fruits, la capacité à la multiplication végétative, la faible taille des téguments au sens large, le faible poids des

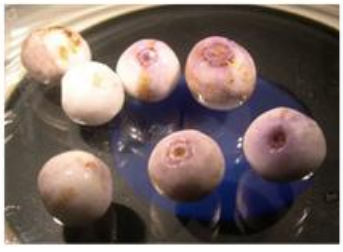
semences, la dispersion par anémochorie, le caractère important de l'embryon lié étroitement au caractère non dormant des semences et le taux important de la fraction lipidique.

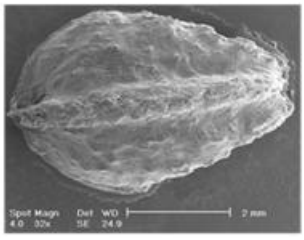
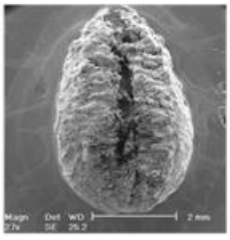
La stratégie 2, va rassembler la capacité à la multiplication végétative, la taille importante des téguments au sens large, le poids important des semences, dans une moindre mesure, le caractère pulpeux des fruits, la dispersion par zoochorie, le caractère important de l'embryon lié à l'occurrence de dormance physique ou physiologique (induite par les téguments de la semence), une grande persistance dans les banques de graines et un taux important en lipide.

De nombreux auteurs ont noté la présence de ces deux stratégies dans leurs études respectives et beaucoup ont mis en avant une dualité entre ces deux stratégies, dualité qui se conçoit assez facilement. Pour ma part, bien que les deux stratégies présentent dans la plupart des cas, des traits de vie antagonistes, je pense que la coexistence de ces deux stratégies au sein du maquis minier néo-calédonien est avantageux d'une part et nécessaire d'autre part afin d'assurer le maintien et la pérennisation de ce biotope surtout quand on sait que ce dernier est vulnérable (projet minier, incendies répétés…) et qu'il ne représente pas une formation climacique en lui-même.

CHAPITRE 2 :

BIOLOGIE DES SEMENCES D'ESPECES HYPERACCUMULATRICES DE NICKEL : REPONSE AUX FACTEURS EDAPHIQUES



CHAPITRE 2 :
BIOLOGIE DES SEMENCES D'ESPECES HYPERACCUMULATRICES DE NICKEL : REPONSE AUX FACTEURS EDAPHIQUES

I/ Introduction

Comme nous l'avons déjà abordé, la biodiversité néo-calédonienne est extrêmement riche et les menaces qui pèsent sur elle en font un « hotspot » reconnu internationalement (Myers et al., 2000). Cette richesse s'exprime à travers le grand nombre et la grande variété des espèces endémiques, dans presque tous les domaines du vivant. Cette richesse est encore plus importante si l'on considère la flore évoluant sur les sols issus des roches ultramafiques. La faible teneur en macroéléments essentiels et la forte teneur en éléments traces métalliques et notamment le nickel jouent également un rôle important dans la promotion et la conservation de la biodiversité néo-calédonienne des roches ultramafiques. Ces facteurs sont caractéristiques du syndrome serpentinique (Brooks, 1987) et vont faire l'objet de cette partie.

En effet, afin de faire face à ces contraintes édaphiques et plus particulièrement, aux quantités importantes de nickel dans les sols, les espèces de la flore ultramafique ont développées des mécanismes adaptatifs leur permettant de croître et d'évoluer sur ces types de milieux. Gaspar et al. (2002) notent l'existence de deux principaux types de réponses physiologiques de résistance aux stress métallifères, une réponse de tolérance et une réponse d'exclusion. Concernant la réponse de tolérance, Brooks et al. (1977) ont définit deux classes d'espèces selon leurs facultés à tolérer des concentrations importantes de nickel dans leurs tissus. Ainsi, une espèce est définie comme étant accumulatrice de nickel lorsque sa concentration est comprise entre 100 et 1000 ppm de la matière sèche et une espèce est définie comme étant hyperaccumulatrice de nickel lorsque les concentrations sont supérieures à 1000 ppm de la matière sèche. Plus récemment, Boyd et Jaffré (2009) ont redéfini 1 catégorie supplémentaire : hypernickelophore (≥10000 ppm).

La Nouvelle-Calédonie est reconnue pour posséder l'une des plus larges diversités d'espèces hyperaccumulatrices de nickel se développant sur roches ultramafiques et elle abrite au moins 50 espèces hyperaccumulatrices de Ni, ce qui la place avec Cuba comme l'un des pays comportant le plus d'hyperaccumulateurs de Ni connus (Reeves, 1992). C'est afin de mieux appréhender et de mieux cerner ces différents mécanismes et plus particulièrement

l'hyperaccumulation du Ni au niveau de la graine que l'ensemble des travaux correspondant à cette deuxième partie a été mené. Ils s'inscrivent dans une démarche plus large engagée dans le cadre d'une ANR dénommée « Ultrabio » faisant intervenir de nombreux partenaires locaux et nationaux. Cette démarche s'est engagée autour d'un modèle comparatif entre deux espèces du genre *Psychotria* (famille des Rubiaceae). Ces deux plantes vivent dans les mêmes conditions édaphiques et climatiques aux Mont Koghis, puisque situées naturellement à 50 mètres l'une de l'autre, mais ont choisi deux stratégies adaptatives différentes face à l'élément nickel présent en quantité importante dans le sol. La première est la seule connue du genre au monde comme hyperaccumulatrice de nickel, *P. douarrei* alors que l'autre ne l'est pas, *P. baillonii*.

En ce qui concerne l'étude des graines proprement dites, les angles d'approches ont été multiples et de ces derniers découle l'organisation de cette partie :

1/ un suivi phénologique *in situ* a été engagé avec pour objectif d'étudier certains aspects de la reproduction des *Psychotria spp.* et ainsi de mieux appréhender leur cycle végétatif : dates de floraison, de fructification… L'intérêt d'un tel travail était de pouvoir prévoir de manière plus précise les périodes de floraison permettant d'anticiper de potentiels croisements entre espèces ; les périodes de fructification pour la collecte des fruits et graines pour l'étude des descendances et l'étude écophysiologique des graines

2/ une étude écophysiologique a donc été menée afin de mieux appréhender la structure et la germination des graines avec un objectif sous-jacent de réduction du temps de latence et d'une augmentation du taux de germination. Cette étude pour partie financée par la Fondation Paul Ars-Cuttolli devait également permettre le transfert de populations ou de génotypes stables et leur maintien et production en conditions contrôlées de laboratoire. En effet, la disponibilité en routine de matériel biologique génétiquement homogène est un pré-requis pour caractériser les réponses adaptatives de *Psychotria* dans des environnements variés via des études génétiques, moléculaires, physiologiques et protéomiques. Toujours dans le cadre de cette étude écophysiologique et vu les résultats importants obtenus concernant la composition biochimique des réserves séminales des espèces de milieu ultramafique (chapitre 1) et notamment de la fraction lipidique des 45 espèces étudiées, une analyse des réserves séminales de *Psychotria spp.* a été réalisée pour déterminer les homologies ou différences existantes. En effet, ces derniers pourraient jouer un rôle essentiel tant au niveau de leur germination que pour leur conservation.

3/ une étude concernant la distribution des éléments minéraux et en particulier du nickel au sein des fruits et graines de ces espèces a été engagée. En effet, de nombreux travaux sur la distribution du nickel et la répartition de ce dernier ont été menés dans les différents organes de plantes hyperacumulatrices de Ni et ont montré que les feuilles sont la plupart du temps le lieu d'accumulation le plus important de ce métal (Jaffré, 1980 ; Brooks, 1987 ; Pouschat, 2009). Cependant, les fruits sont parfois riches en nickel (Jaffré, 1980 ; Brooks, 1987) par contre, les informations concernant la présence et la distribution du nickel au sein de la graine sont rares (Minguzzi et Vergnano, 1948 ; Psaras et Manetas, 2001 ; Bhatia et al., 2003). Dans l'objectif d'une meilleure appréciation et d'une meilleure compréhension des phénomènes adaptatifs d'absorption, de concentration de l'élément Ni au sein des plantes tolérantes et plus particulièrement au sein de leurs graines, nous avons choisi de comparer l'ultrastructure et la répartition minérale au sein de graines de deux espèces du genre *Psychotria* (Rubiaceae)*, P. douarrei* (hyperaccumulatrice) et *P. baillonii* (non hyperaccumulatrice). Les résultats obtenus feront l'objet d'une publication dans les prochains mois (Fogliani et al., in prep.), certains des éléments que nous fourniront en anglais en sont extraits. Ces derniers plus que prometteurs, nous ont conduits à étendre cette étude chez d'autres espèces hyperaccumulatrices pour confirmer ou non les observations faites sur *P. douarrei*.

4/ enfin, les prémices, tout aussi prometteurs, d'une étude protéomique concernant les graines de *Psychotria douarrei versus Psychotria baillonii* ainsi que l'étude protéomique de leur comportement en réponse à différentes concentrations de nickel durant la phase germinative *stricto sensu* vont être présentés. Plusieurs raisons ont motivé notre implication dans cette voie de recherche. Le taux important de lipides et de protéines au sein des semences évoluant sur les sols issus de roches ultramafiques suggère l'existence de mécanismes impliquant l'appareil métabolique concernant les phénomènes adaptatifs au cours de la germination *stricto sensu*. Les mécanismes adaptatifs sont tributaires de l'expression des gènes qui se traduit au niveau fonctionnel par l'expression d'un ensemble de protéines. Certains auteurs ont mis en évidence dans des travaux récents de protéomique, des mécanismes importants concernant le contrôle de la germination (Rajjou et al., 2004 ; Holdsworth et al., 2007). L'utilisation d'α-amanitine, agent bloquant la transcription et l'utilisation de cycloheximide, agent bloquant de la traduction a pu montrer que la réalisation de la germination *stricto sensu* n'était pas strictement tributaire de la phase de transcription des gènes et que, à l'inverse, ce dernier était bloqué en présence de cycloheximide. Ils ont pu montrer ainsi que l'ensemble de l'outillage et des mécanismes nécessaires pour induire la germination *stricto sensu* était déjà présent au sein de la graine et que la germination *stricto sensu* ne nécessitait pas de néo-

synthèse. Ainsi, dans l'objectif d'identifier des protéines qui joueraient un rôle dans les mécanismes adaptatifs développés par *Psychotria douarrei* face au stress métallifère et plus particulièrement face au nickel durant la phase de germination *stricto sensu*, une étude protéomique a été menée et les résultats obtenus sont présentés.

II/ Suivi phénologique de *Psychotria douarrei* et de *Psychotria baillonii*

12 plants de *P. douarrei* et 12 plants de *P. baillonii* (Figure 33) localisés en sous-bois de forêts dense humide des Monts Koghis au sud-ouest de la Grande Terre ont été suivis pendant 3 années depuis le mois de janvier 2007 jusqu'au mois de janvier 2010. Chaque mois et sur chaque plant, le nombre de fleurs et de fruits ainsi que leur stade de maturité ont été relevés. L'analyse des résultats a été effectuée en faisant la moyenne du nombre de fleurs en boutons ou épanouies et de fruits verts ou matures pour chaque mois de l'année pendant les 3 années.

Figure 33 : Plants de *Psychotria douarrei* (A) et de *Psychotria Baillonii* (B) en fruit

Psychotria douarrei (Beauvisage) est un arbuste se développant en forêt humide sur sol issu de roches ultramafiques. Les feuilles sont gaufrées, pétiolées et opposées. L'inflorescence est une panicule terminale et dressée contrairement à *Psychotria baillonii*. Ces fleurs sont à corolle tubulaire rosée à rouge vif (Figure 34A).

Psychotria baillonii (Schltr.) est un arbuste se développant en forêt humide et aussi bien sur sol volcano-sédimentaire que sur sol ultramafique, critère important qui a conduit au choix de nos espèces puisque toutes les deux se développent l'une à coté de l'autre. Ses feuilles sont pétiolées et opposées. L'inflorescence est une panicule ailée tombante. Ses fleurs sont blanches et de très petite taille (Figure 34B).

Figure 34 : *Psychotria douarrei* en fleurs (A) et *Psychotria baillonii* en fruit (B)

Les résultats obtenus concernant les données de suivis des floraisons et fructifications ont été utilisés afin de représenter sous forme graphique la phénologie de chacune de ces deux espèces (Figure 35 & Figure 36).

L'analyse de ces données révèle que la floraison de *P. douarrei* s'étale de février à novembre avec un épanouissement des fleurs maximal de mai à juillet. Les boutons floraux qui apparaissent après cette période semblent ne pas atteindre l'épanouissement et tombent au sol. Cette floraison est régulière chaque année avec une quantité de boutons floraux plus ou moins importante mais une quantité de fleurs épanouies quasi constante.

A l'inverse, les plants de *P. baillonii* des populations utilisées pour nos relevés n'ont présenté pendant les années 2008 et 2009 qu'une floraison très faible et sur une période courte qui n'a pas été détectée par nos relevées espacés d'un mois. La présence de fruits en nombre faible semble cependant indiquer qu'une floraison a bien eu lieu. Cette floraison constatée en début d'année 2007, fin d'année 2009 et début d'année 2010, montre qu'elle s'étale de fait sur une période courte de novembre à février avec des fleurs épanouies sur quelques semaines au mois de janvier.

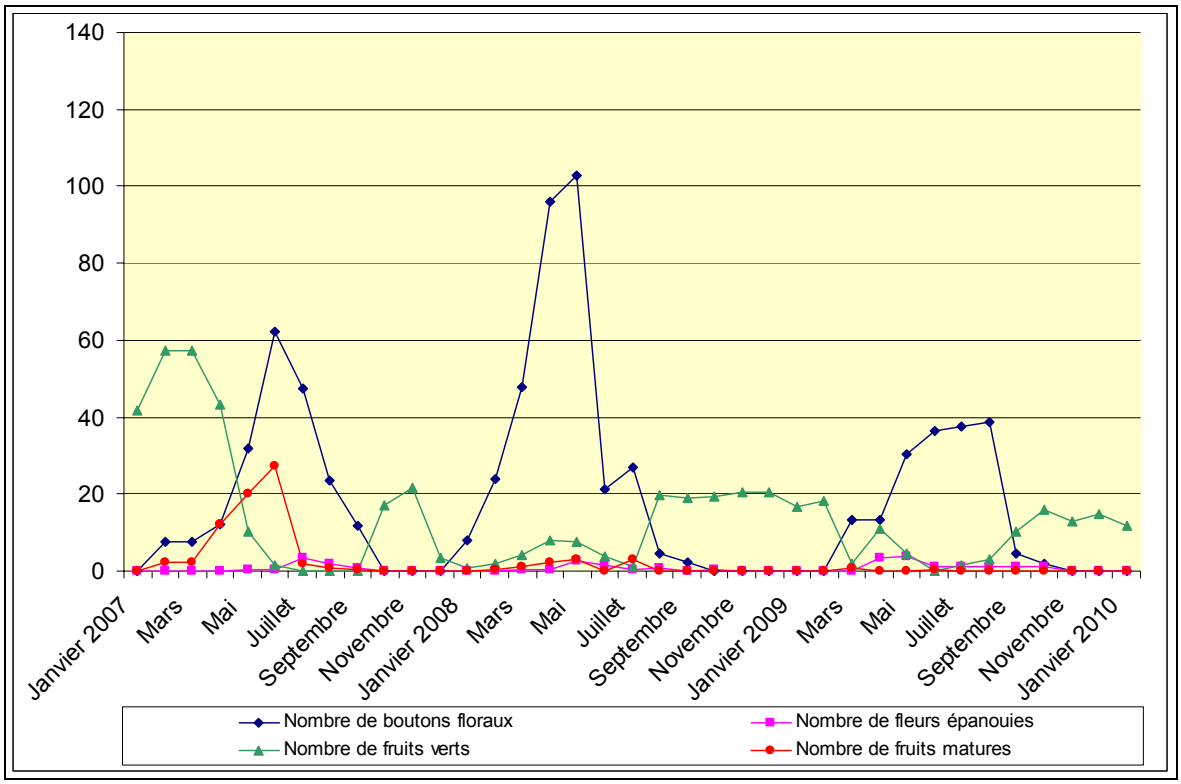


Figure 35 : Suivi phénologique pendant 3 années de *P. douarrei*

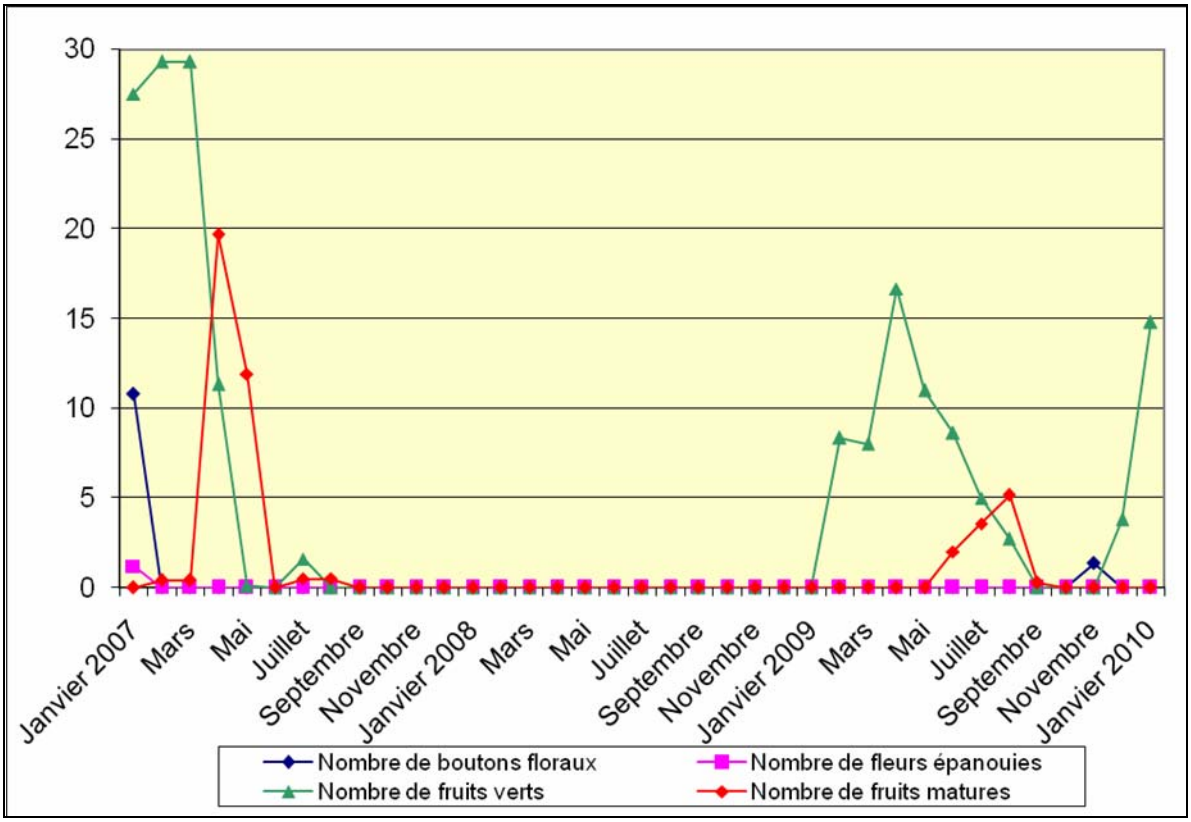


Figure 36 : Suivi phénologique pendant 3 années de *P. baillonii*

Ces premiers résultats sur la floraison de ces deux espèces, qui méritent cependant d'être approfondis, indiquent clairement de part des périodes de floraison très différentes dans le temps, qu'une fécondation croisée est impossible.

En ce qui concerne la fructification, il est à noter que le nombre de fruit arrivés à maturité est beaucoup plus faible que le nombre de fruits verts relevés et ceci quelle que soit l'espèce considérée. Il semble donc que, tout comme pour les fleurs, une perte importante en fruits a lieu au cours du temps de maturation, réduisant ainsi d'autant les chances de voir un renouvellement de la population. Ces fruits et graines ont pu malgré tout être collectés pour les études spécifiques de leur structure.

III/ Etude écophysiologique des graines de *P. douarrei* et de *P. baillonii*

III. 1/ Structure du fruit et de la graine

Les fruits des deux espèces de *Psychotria* étudiées sont des drupes à mésocarpe pulpeux contenant la plupart du temps deux pyrènes. Les fruits des *Psychotria douarrei* sont légèrement plus importants en taille que ceux de *P. baillonii*. De plus, les fruits de *P. douarrei* sont verts à l'état jeune et tournent au blanc puis mauve à maturité. Les fruits juvéniles de *P. baillonii* sont verts puis deviennent blancs à maturité (Figure 37).

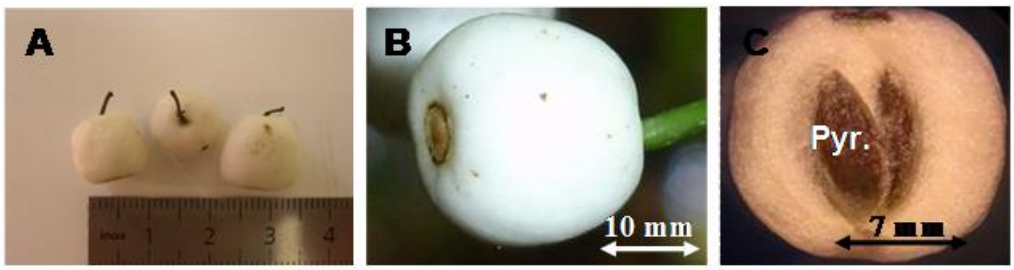


Figure 37 : Fruits entiers de *Psychotria douarrei* non matures (A), de *Psychotria baillonii* (B) et coupe transversale d'un fruit de *Psychotria douarrei* mature (C), Pyr. : Pyrène.

L'observation de la structure externe des graines des deux espèces de *Psychotria* mets en évidence la forme planoconvexe des deux graines, la face ventrale étant aplatie et la face dorsale bombée (Figure 38). La présence d'une crête chez *P. douarrei* et d'une invagination peu profonde chez *P. baillonii* au niveau de leur face dorsale distingue les deux types de graines (Figure 38).

Un aspect commun aux deux graines est la présence d'une fente de «prégermination» au niveau de la face ventrale. Par ailleurs, dans les deux cas, la graine *stricto sensu* est entourée d'un endocarpe plus ou moins épais et non fusionnée avec le tégument de la graine *stricto sensu* que l'on peut nettement distinguer lors de l'observation en coupe transversale (Figure 39).

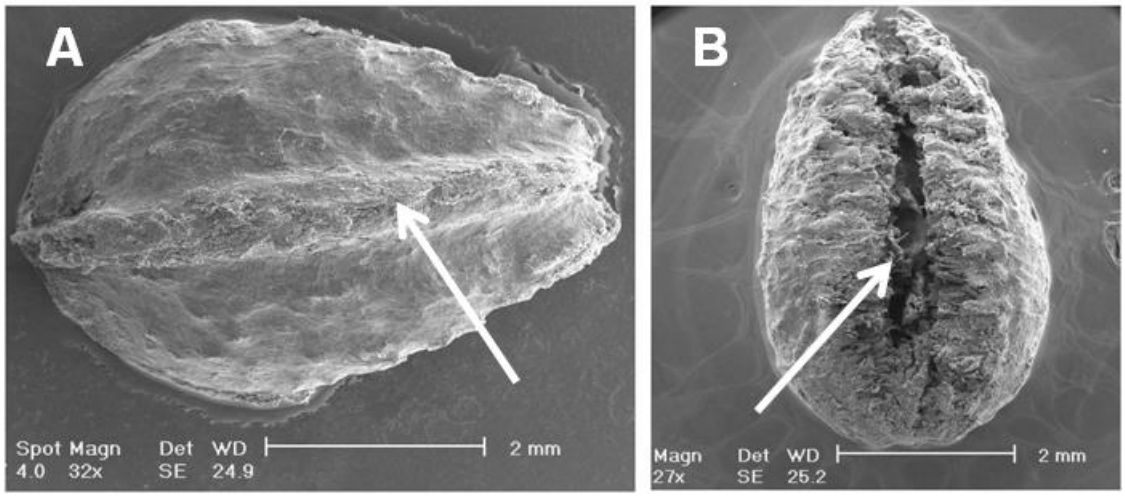


Figure 38 : Structure externe de la graine de *Psychotria douarrei* (A) et de *P. baillonii* (B) métallisées à l'or et observées au microscope électronique à balayage. Les flèches indiquent les zones de crête et d'invagination chez *P. douarrei* et *P. baillonii* respectivement. (D'après Fogliani et al., in prep)

L'analyse de la structure interne des graines de *P. douarrei* et de *P. baillonii* montre un endocarpe qui semble plus épais chez *P. baillonii*. On distingue également chez les deux graines la présence d'un albumen volumineux et d'un embryon de petite taille à deux cotylédons. Les graines de ces deux espèces sont donc de type albuminé.

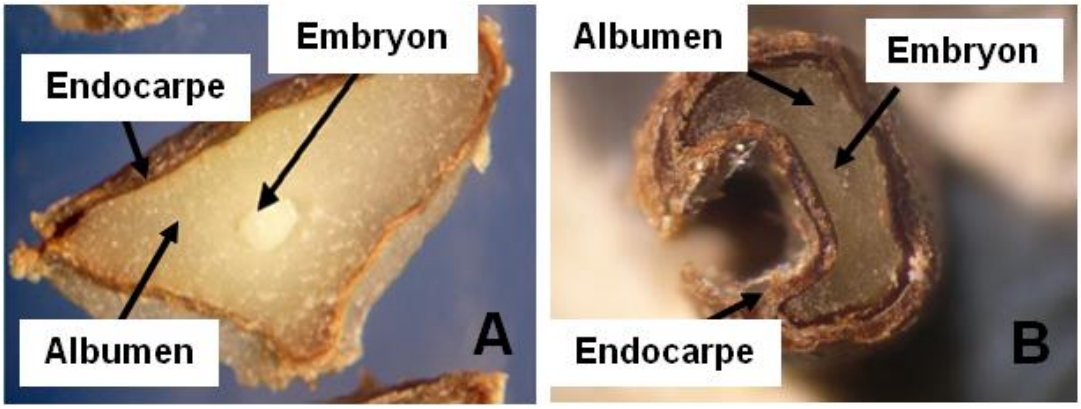


Figure 39 : Structure interne de la graine de *Psychotria douarrei* (A) et de *P. baillonii* (B)

L'analyse des données concernant les caractéristiques structurales des graines des deux espèces de *Psychotria* montre des caractères proches à ceux retrouvés chez la plupart des espèces du clade Psychotrieae (Razafimandimbison et al., 2008 ; Tableau 12). La présence de crête sur la face dorsale et la proéminence des fentes de pré-germination de *Psychotria douarrei* et de *P. baillonii*, ainsi que la présence d'une invagination peu profonde chez *P. baillonii* et d'une fente de pré-germination bien marquée sont autant de caractères qui les lient au clade des Psychorieae et au genre *largo sensu* des *Psychotria* (Piesschaert, 2001 ; Coelho et Barbosa, 2004).

La taille des graines tend à suivre la tendance des fruits, ainsi, les graines de *P. douarrei* sont de taille plus importante que celle de *P. baillonii*. Ces valeurs sont en accord avec les valeurs concernant la taille des pyrènes des espèces du genre *Psychotria*. Néanmoins, la taille des graines de *P. douarrei* semble être parmi les plus importantes du genre (Piesschaert, 2001).

Tableau 12 : Différentes caractéristiques des graines de *P. douarrei* et de *P. baillonii* (d'après Fogliani et al., in prep.)

Analyzed parameters	***Psychotria douarrei***	***Psychotria baillonii***
External structure[1]		
Weight (mg)	10.14 ± 2.67	11.29 ± 2.32
Length (mm)	7.00 ± 1.02	5.45 ± 0.44
Wide (mm)	4.75 ± 0.63	2.12 ± 0.22
Thickness (mm)	2.24 ± 0.39	1.83 ± 0.14
Internal structure[2]		
Endocarp thickness (mm)	0.1-0.15	0.2-0.3
Endosperm size (mm): Length x Wide x Thickness	6.1-7.9 **x** 4.2-5.2 **x** 1.9-2.3	3.8-4 **x** 1.9-2.1 **x** 0.5-0.6
Embryo size (mm): Length **x** Wide **x** Thickness	0.6-0.7 **x** 0.35-0.4 **x** 0.28-0.3	0.9-1 **x** 0.15-0.2 **x** 0.18-0.2
Length ratio embryo/endosperm	0.09-0.10	0.24-0.25

[1] *Values are means ± SE,* [2] *values are the range on ten replicates.*

L'analyse de la structure interne révèle un endocarpe moins épais des graines de *Psychotria douarrei* comparé à *Psychotria baillonii*, ce qui confirme nos observations réalisées plus haut. L'albumen de *P. baillonii* est de teinte rosée et celui de *P. douarrei* est blanchâtre, les deux graines sont composées majoritairement d'albumen puisque ce dernier représente plus des ¾ de la taille de chaque semence. Le ratio longueurs embryon/albumen est par conséquent très petit. Cependant, celui de *P. baillonii* (0,25) reste plus important que celui de *P. douarrei* (0.1).

Les valeurs de ratio embryon/albumen sont sensiblement les même que les ratios embryon/graine (*P. douarrei* : 0,1 ; *P. baillonii* : 0,18) du fait de la faible épaisseur des endocarpes et des téguments de la graine. Les ratios embryon/graine des deux espèces se rapprochent des valeurs retrouvées pour la plupart des espèces de Rubiaceae (0,35 ± 0,25) (Forbis et al., 2002) bien que le ratio des longueurs embryon/graine de *P. douarrei* semble se positionner dans les valeurs les plus faibles de la moyenne obtenue par Forbis et al. (2002) pour la famille des Rubiaceae.

Une fois l'extraction de l'embryon des albumens effectuée, il est facile de distinguer des petits embryons axiles et spatulés. On peut remarquer une nette différence concernant l'aspect moins spatulé des embryons de *P. baillonii* comparé à *P. douarrei* (Figure 40). Si l'on considère la classification des graines initiée par Martins (1946) basée sur la taille, la forme et la position de l'embryon, nos graines sont du type FA1 constitué par des embryons fins du type spatulé et axiles (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006). Les résultats rapportés par ces mêmes auteurs concernant certaines espèces de la famille des Rubiaceae, confirment notre classification pour ce qui est des graines de *P. douarrei* et de *P. baillonii*. Si l'on considère la même classification et les liens que différents auteurs mettent en avant concernant les types d'embryon et les différentes formes de dormance (Baskin et Baskin, 1998 ; Baskin et Baskin, 2004 ; Forbis et al., 2002 ; Finch-savage et Leubner-Metzger, 2006), on devrait s'attendre à voir au sein des graines de *P. douarrei* et *de P. baillonii* des graines non-dormantes et des graines à dormance physiologique.

III.2 Viabilité et germination

Le taux de viabilité concernant le lot de *P. douarrei* utilisé dans cette expérience a été évalué à 97 ± 6 % par le test de viabilité au chlorure de tétrazolium (Figure 40 A, B). Un second lot utilisé dans le cadre du travail dédié à la protéomique (effet du nickel) détenait un taux de viabilité de 98,5 ± 1.3 %.

Le taux de viabillité des graines du lot collecté de *P. baillonii* est plus faible (53±13%) que pour *P. douarrei* diminuant d'autant la capacité de renouvellement de la population (Figure 40 C,D).

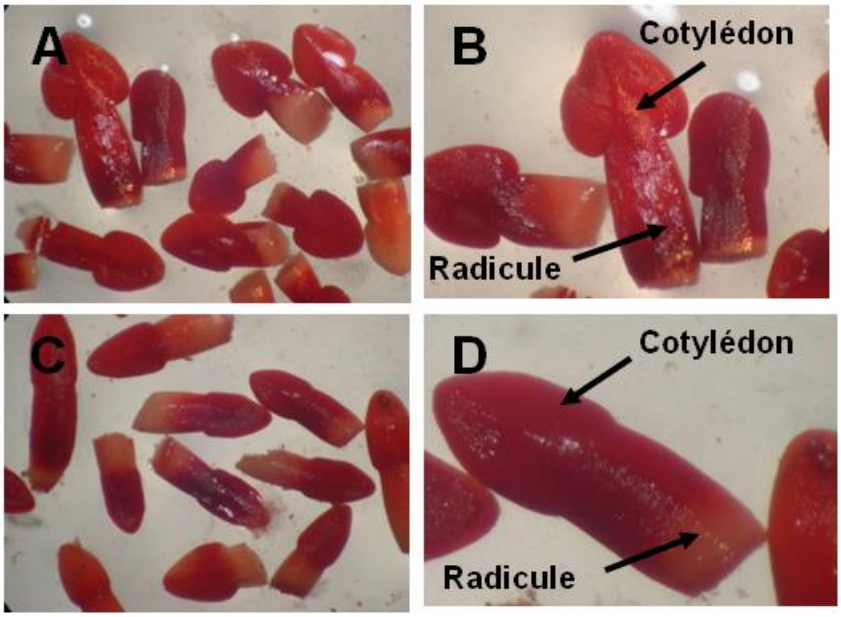


Figure 40 : Test de viabilité réalisé sur des embryons de *Psychotria douarrei* (A) et *P. baillonii* (C) et zoom sur un embryon de *P. douarrei* (B) et de *P. baillonii* (D)

Les résultats des tests de germination des graines *stricto sensu* de *P. douarrei* avec ou sans endocarpe exprimés en pourcentage de germination cumulée +/- l'écart type montrent clairement que la graine entière présente un temps de latence important de 16 jours et une germination étalée (Figure 41). En effet, après 70 jours, la phase dite de plateau n'est pas tout à fait atteinte et toutes les graines potentiellement viables (dont le taux a été déterminé à 97±6 % par le test de viabilité au chlorure de tétrazolium) n'ont pas germées.

A l'inverse les graines débarrassées de leur endocarpe germent rapidement dès 8 jours et de manière synchrone puisque que le taux de germination maximum est rapidement atteint après 25 jours. Ceci prouve que l'endocarpe joue un rôle d'inhibiteur mécanique à la germination soit en exerçant une contrainte mécanique à la percée radiculaire, soit par le biais d'inhibiteurs chimiques présents dans les enveloppes séminales en empêchant la percée de la radicule qui est facilitée par le ramollissement des tissus.

Dans les deux cas, ces graines peuvent être classées comme Non deep-PD, c'est à dire comme ayant une dormance physiologique induite par les enveloppes de la graine selon la classification de Baskin et Baskin (2004).

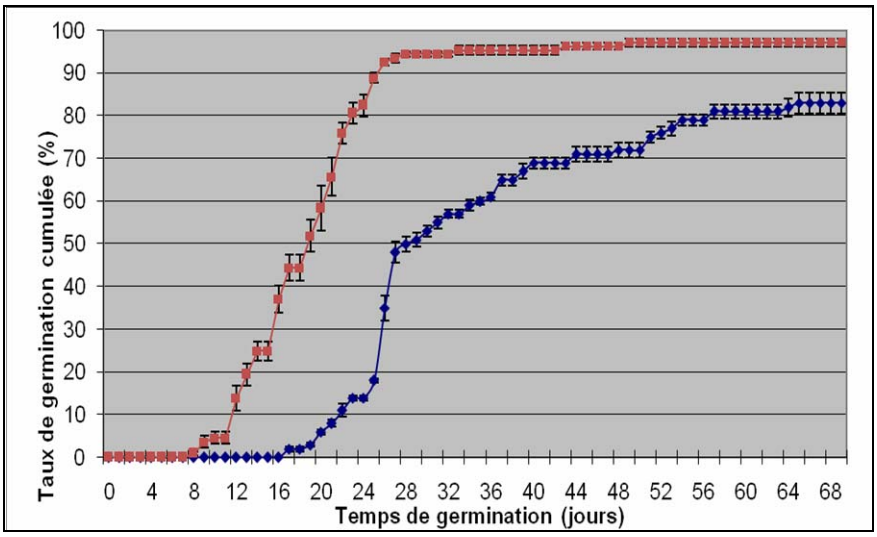


Figure 41 : Taux de germination cumulé en fonction du temps de graines de *Psychotria douarrei* mises à germer à 25°C à la lumière avec (♦) ou sans endocarpe (■).

L'étude menée uniquement sur les graines entières de *P. baillonii* (Figure 42) faute d'une quantité de graines suffisante montre un profil de germination identique avec un temps de latence long de 16 jours et une germination étalée dans le temps. Cela laisse à penser que l'extraction de l'endocarpe chez *P. baillonii* aurait les mêmes effets et que le type de dormance en présence serait également de type Non deep-PD défini par Baskin et Baskin (2004).

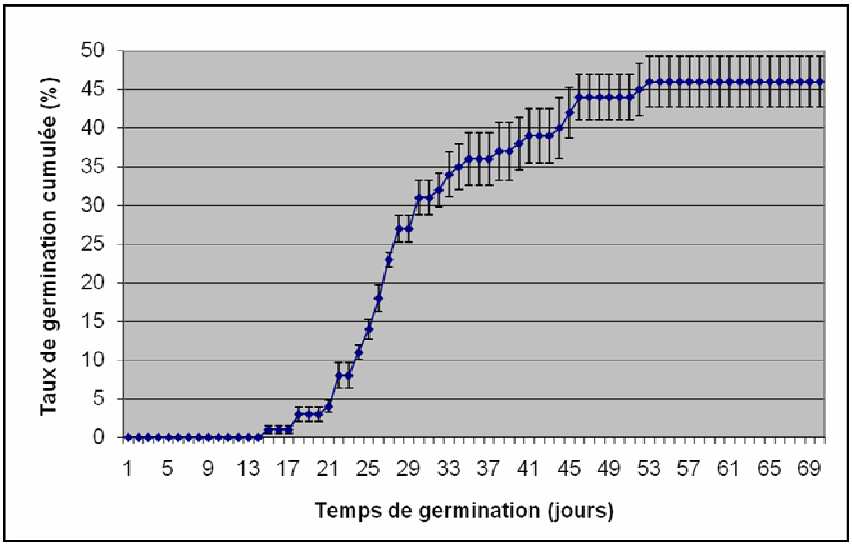


Figure 42 : Taux de germination cumulé en fonction du temps de graines de *P. baillonii* mises à germer à 25°C à la lumière avec leur endocarpe.

Enfin, dans le cadre d'une multiplication optimale de ces espèces, l'extraction de l'endocarpe de la semence se révèle indispensable pour permettre une gemination rapide et synchrone.

III.3/ Taux d'humidité et composition biochimique des réserves séminales

Dans le cas des graines matures de *P. douarrei*, leur taux d'humidité, de l'ordre de 15%, est relativement élevé pour des graines orthodoxes (Tableau 13). Pour les graines orthodoxes, la teneur en eau peut être abaissée jusqu'à 5% environ sans perte de viabilité (Angelovici et al., 2010). Par contre, les graines récalcitrantes, qui meurent lors d'une dessiccation, se caractérisent par une teneur en eau relativement plus élevée, le plus souvent de 20 à 50% du poids frais. Ainsi, le taux d'humidité déterminé sur la graine entière des deux espèces *P. douarrei* (15%) et de *P. baillonii* (11%) montre des graines à tendance orthodoxe. Il reste cependant difficile dans l'état actuel de nos connaissances de déterminer s'il s'agit d'espèces orthodoxes vraies ou de graines de type intermédiaire. La quantité de graines de *P. baillonii* que nous avons pu obtenir étant très limitée, il ne nous a pas été possible de mener la totalité des expérimentations nécessaires sur cette espèce. Des expériences de germination/viabilité sur des graines matures amenées à des taux d'humidité inférieurs à 5% seraient nécessaires pour confirmer l'hypothèse de l'appartenance des deux espèces de *Psychotria* à la catégorie des plantes orthodoxes.

Tableau 13 : Taux d'humidité et composition biochimique des réserves séminales des graines de *Psychotria douarrei*.

Protéines totales (mg/100mg de graine sèche)	Lipides neutres (mg/100mg de graine sèche)	Sucres hydrosolubles (mg/100mg de graine sèche)	Amidon (mg/100mg de graine sèche)	Taux d'humidité (%)
8,87 ± 0,63	17,30 ± 0,66	6,07 ± 0,52	0,37 ± 0,21	15,5 ± 3,2

Le Tableau 13 fournit la composition de chacun des principaux constituants des réserves séminales des graines de *Psychotria douarrei*. Il révèle une graine riche en lipides avec une proportion de 17,30%. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Gupta et al., 2002, à savoir qu'une quantité importante de nickel dans le sol augmente la quantité des réserves séminales en lipides pour *Brassica juncea L.* espèce hyperaccumulatrice de Pb, Cu et Zn. Gupta et al. expliquent ce phénomène par la réduction de la croissance végétative due à l'augmentation de la concentration en nickel. Ainsi, la quantité d'énergie économisée serait probablement allouée au développement des traits de la reproduction afin d'acquérir une vigueur encore plus importante des semences (Fenner et Thompson, 2005).

L'analyse des acides gras constitutifs (Tableau 14) montre une prédominance des acides gras insaturés parmi les acides gras identifiés. Il reste cependant un acide gras majoritaire non identifié qui représente plus de 50% des acides gras. Il est donc à ce stade de l'expérimentation difficile de tirer quelconques conclusions. Néanmoins, l'étude menée par Gupta et al, 2002 sur les graines de *Brassica juncea*, a montré tout d'abord, une prédominance des acides gras insaturés mais également le fait que l'application d'une solution de concentration croissante de chlorure de nickel allant de 5, 10, 20 à 40 ppm dans le sol entrainait une diminution du taux d'acide érucique et une augmentation de l'acide linolénique (C18 :3Δ9,12,15) et l'acide palmitique (C16 :0). Les auteurs notent également qu'une concentration maximum d'acide oléique (C18 :1Δ9) est obtenue pour des concentrations en Ni de 10 à 20 ppm. Ce qui est en accord avec nos valeurs faibles retrouvées chez *Psychotria douarrei* (7,35%). Il est également intéressant de rappeler l'intérêt nutritionnel de la fraction lipidique des graines de *Psychotria douarrei*, aucune conclusion ne peut pour l'instant émerger mais déjà, on observe une quantité assez faible d'acide palmitique (4,21%) qui représente pourtant en général l'acide gras saturé majoritaire de la plupart des graines (Connor et al., 2007, Black et al., 2006). On peut aussi noter, la quantité importante d'acide gras linoléique (27,62%) qui peut représenter un intérêt nutritionnel établis puisqu'il est le précurseur des Ω-3 qui font fureur actuellement dans l'industrie alimentaire (Dubois et al., 2007).

Tableau 14 : Composition en acides gras des lipides neutres extraits de semences de *P. douarrei.*

Acides gras saturés	**Palmitique (C16:0)**	**4,21%**
	Stéarique (C18:0)	**0,91%**
Acides gras insaturés	**Palmitoléique (C16:1Δ9)**	**Tr***
	Oléique (C18:1Δ9)	**7,35%**
	Vaccénique (C18:1Δ11)	**1,01%**
	Linoléique (C18:2Δ9,12)	**27,62%**
Total des acides gras identifiés		**41,10%**
Acide gras 1 non identifié		55,99%
Acide gras 2 non identifié		2,86%

*Tr = traces

La proportion de protéines, de sucres hydrosolubles ainsi que d'amidon reste faible. La proportion de protéines (8,87% ± 0,63) est en accord avec les proportions retrouvées chez des espèces de *Rubiaceae*. En effet, Barlay et Earle (1970) reportent des teneurs en protéines entre 5 et 35%. La teneur en amidon est aussi en accord avec les résultats de la littérature concernant des graines de *Coffea arabica* (1 à 2%) (Giorgini et Campos, 1992). Néanmoins, les résultats obtenus concernant la fraction de sucres hydrosolubles semblent être très inférieurs comparés à des espèces de *Psychotria spp., P. rubra* (62%) et *P. serpens* (52,4%) (Ko et al., 1998). Cette différence importante de nos résultats concernant les sucres hydrosolubles en comparaison de ceux de la littérature pourrait être la conséquence des sucres non hydrosolubles non extraits par la méthode utilisée.

IV/ Caractéristiques ultrastructurales et minérales du fruit et de la graine de *Psychotria douarrei* et de *P. baillonii.*

Les résultats obtenus dans cette partie font l'objet d'une publication en cours de rédaction : « Fogliani, B., Rabier, J., Zongo, C., Schowb, I., Notonier, R., 2010, Comparison of minerals distribution in seeds of two new Caledonian *Psychotria* species including the metal hyperaccumulator *P. Douarrei.*

IV.1/ Composition et distribution des éléments minéraux dans les semences de deux espèces de Psychotria néo-calédoniennes dont l'hyperaccumulatrice P. douarrei.

Une première étape a consisté à mener une analyse minérale de surface au niveau de 3 points sur la face convexe et de 3 points sur la face plane (Figure 43). Elle a montré qu'il n'existait pas de variation significative entre les 3 points d'une même face mais que des variations pouvaient exister en fonction de la face et de l'élément considérés (Tableau 15).

Dans le cas de *P. douarrei*, il y a significativement plus de calcium sur la face convexe alors que le Ni, le K, le S et l'Al sont plus importants sur la face plane. Tout les autres éléments (Na, Cl, Si, Mg, P, Fe) sont dans des proportions identiques sur les deux faces.

Tableau 15 : *Psychotria douarrei* and *Psychotria baillonni* seed surfaces analyses. Proportions of the different considered elements. (means of 6 replicates) (d'après Fogliani et al., in prep.)

	P. douarrei		***P. baillonii***	
	Flat side	Convex side	Flat side	Convex side
Ca	24.98 ± 4.70 ^{B}	32.04 ± 2.10 ^{A}	14.30 ± 3.55 ^{C}	11.25 ± 1.93 ^{C}
Ni	17.21 ± 1.53 ^{A}	13.80 ± 2.06 ^{B}	1.00 ± 0.50 ^{C}	1.41 ± 0.20 ^{C}
K	16.50 ± 3.06 ^{B}	12.71 ± 1.25 ^{C}	16.17 ± 0.57 ^{B}	19.88 ± 2.09 ^{A}
Na	5.92 ± 2.03 ^{B}	6.94 ± 2.34 ^{B}	19.68 ± 1.84 ^{A}	19.82 ± 4.66 ^{A}
Cl	8.06 ± 1.29 ^{B}	9.05 ± 1.62 ^{B}	15.77 ± 1.03 ^{A}	14.49 ± 0.92 ^{A}
S	12.59 ± 1.61 ^{A}	10.63 ± 0.98 ^{B}	8.64 ± 0.87 ^{C}	6.87 ± 1.77 ^{D}
Si	1.56 ± 0.80 ^{B}	3.02 ± 0.41 ^{B}	10.90 ± 1.69 ^{A}	10.63 ± 1.64 ^{A}
Al	3.20 ± 1.30 ^{B}	1.58 ± 1.27 ^{C}	5.52 ± 0.31 ^{A}	6.06 ± 1.30 ^{A}
Mg	4.94 ± 2.06 ^{A}	5.18 ± 1.08 ^{A}	4.39 ± 0.46 ^{A}	5.17 ± 0.96 ^{A}
P	3.43 ± 0.75 ^{A}	364 ± 0.36 ^{A}	1.50 ± 0.71 ^{B}	1.81 ± 0.89 ^{B}
Mn	Nd	Nd	Nd	Nd
Fe	1.61 ± 0.37 ^{C}	1.40 ± 0.37 ^{C}	2.14 ± 0.22 ^{B}	2.64 ± 0.32 ^{A}

Different letters above each proportion indicate a significant difference by Student Test ($P<0.05$).

Dans le cas de *P. baillonii*, les différences sont moins marquées car à l'exception du K, du S et du Fe, tous les autres éléments sont en proportions équivalentes sur les deux faces.

La comparaison entre *P. douarrei* et *P. baillonii* montre clairement que le nickel est facilement détectable sur la surface des graines de *P. douarrei* (Figure 43G) avec une forte proportion estimée à 15,5% alors que chez *P. baillonii* la quantité est négligeable de l'ordre de 1%. Les résultats (Tableau 15) montrent également chez *P. douarrei*, que les proportions de S (11,61%[1]), P (3,53%[1]) et Ca (28,51%[1]) sont 1,5 fois à 2,2 fois plus importantes que chez *P. baillonii*. A l'inverse, chez *P. douarrei* les proportions de Fe (1,51%[1]), de Cl (8,56%[1]) et d'Al (2,39%[1]) sont 1,5 à 2,4 fois moins importantes que chez *P. baillonii*. Plus encore, dans le cas de Na (6,43%[1]) et de Si (2,29%[1]), cette différence est encore plus visible avec 3 à 4,7 fois plus de ces éléments chez *P. douarrei* que chez *P. baillonii*. Pour Mg et K, il n'y a quasiment aucune différence entre les deux espèces.

Ces informations semblent indiquer que la répartition est fonction de l'élément considéré et qu'une orientation existe pour certain d'entre eux. Si l'on se concentre sur l'élément nickel, le fait marquant de cette analyse est que ce dernier est en quantité non

[1] Valeurs de *P. douarrei*

négligeable au niveau de l'endocarpe de *P. douarrei* et en quantité très faible au niveau de celui de *P. baillonii*. Cette donnée va dans le sens des analyses réalisées depuis le sol jusqu'au fruit et la graine de ces deux espèces (Tableau 16). En effet, l'élément nickel est clairement hyperaccumulé au niveau des feuilles de *P. douarrei* (18587 ppm) confirmant le caractère hyperaccumulateur de cette espèce à l'inverse de *P. baillonii* (550 ppm) qui apparaît comme simple accumulatrice. Si l'on considère le fruit et la graine, on constate que ces parties de la plante sont également exposées au nickel chez *P. douarrei* avec près de 14000 ppm et plus de 9000 ppm dans le fruit et la graine respectivement. Chez *P. baillonii* ces parties ne sont que très peu exposées, 30 et 40 ppm respectivement.

Outre l'élément nickel, il est important de noter que l'élément calcium est également fortement concentré dans les fruits et les graines de *P. douarrei* et dans une moindre mesure de *P . baillonii*. Aussi, l'analyse de surface à révéler la présence de cristaux de calcium. Un agrandissement de ces derniers et leur analyse aux rayons X par point ont montré qu'il s'agissait de cristaux d'oxalate de calcium présents sous formes d'aiguilles sur les deux faces de l'endocarpe des graines des deux espèces (Figure 43).

Tableau 16 : Elemental analyses of the different plant organs of *P. douarrei* and *P. baillonii* and of the soil (15 cm deep top layer) from their own ground (d'après Fogliani et al., in prep.)

Plant species	Element	Soil analyses		Plant analyses				
		Soil (total)	DTPA extractable	Roots	Stem	Leaves	Entire Fruit (including seed)	Seed (with endocarp)
P. douarrei	**Mg**	29867	588	500	600	2300	1990	1600
	P	342	1.61	108	169	453	926	1141
	S	Nd	Nd	827	941	2274	2404	2181
	Cl	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	19299	6190
	K	3634	98	2700	5600	10200	18508	7500
	Ca	5005	Nd	3500	4800	14300	11356	11700
	Mn	9760	1832	402	65	646	469	542
	Ni	**4094**	**162**	**3084**	**9813**	**18587**	**14048**	**9360**
P. baillonii	**Mg**	28519	535	700	900	4300	2290	1000
	P	304	1.52	180	278	752	913	1025
	S	Nd	Nd	588	835	3704	1173	1432
	Cl	Nd	Nd	4699	5310	13843	15022	8639
	K	4136	106	5300	8400	13500	24027	3000
	Ca	3797	Nd	6200	8900	16100	7733	6400
	Mn	8418	1727	75	47	145	26	15
	Ni	4535	171	430	230	550	30	40

Values are the means of three replicates. Nd: non determined

L'analyse suivante a consisté à réaliser des coupes transversales des graines des deux espèces. Ces dernières confirment une organisation générale similaire entre les deux graines à savoir un endocarpe qui entoure un albumen volumineux et un embryon de petite taille situé à une extrémité de la graine (Figure 43D).

La zone encadrée de la Figure 43D a ensuite fait l'objet d'un coulage dans un gel à cryotomie avant d'être coupée en couche mince et d'être métallisée au carbone afin de réaliser des analyses par point des éléments minéraux constitutifs au microscope électronique à balayage associé aux rayons X (Figure 44). Des cartographies ont également été réalisées et sont présentées soit brutes (Figure 45, Figure 48) soit travaillées à l'aide du Logiciel Image J afin de mieux faire ressortir les contrastes (Figure 46, Figure 47, Figure 49).

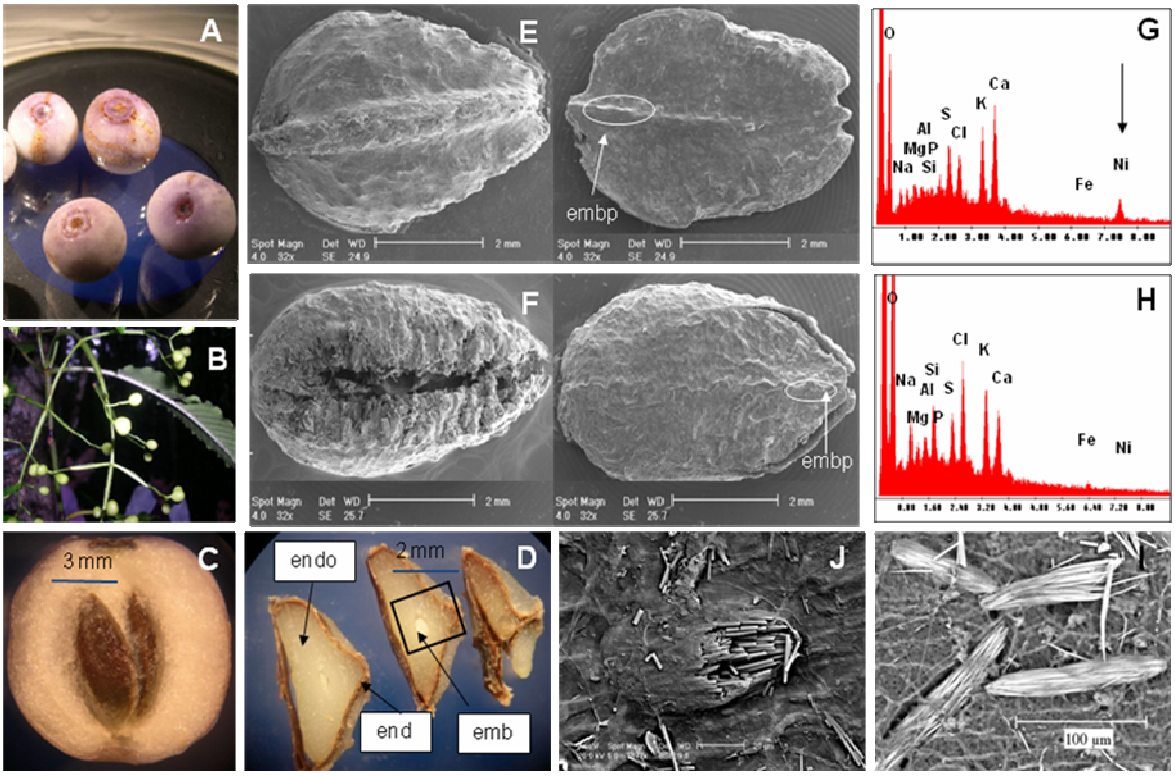


Figure 43 : Fruit and seed structure of *P. douarrei* and *P. baillonii*. A, B: *P. douarrei* (A) and *P. baillonii* (B) fruits; C: Fruit structure of *P. douarrei* showing seeds position; D: Transversal cuts of a *P. douarrei* seed showing endocarp (end), endosperm (endo) and embryo (emb) positions and selected part (black square) using for cryosectioning followed by SEM observations and analyses; E, F: Convex (at the left) and flat side (at the right) views of *P. douarrei* (E) and *P. baillonii* (F) whole seeds (i.e. with endocarp) viewed using an SEM after metallization with gold and localisation of the embryo position (embp); G, H: EDS spectra of analysis of *P. douarrei* (G) and *P. baillonii* (H) seed surface; I, J: Calcium oxalate raphides partially visible on the endocarp surface of *P. douarrei* (I) and totally visible on *P. baillonii* one (J). (d'après Fogliani et al., in prep.)

Les résultats obtenus confirment l'organisation précédemment décrite pour les deux espèces (Figure 44). Des éléments supplémentaires apparaissent, tout d'abord la présence de cristaux d'oxalate de calcium caractérisés par leur pic d'émission et la proportion caractéristique 1 pour 4 de Calcium sur Oxygène (Tableau 17).

Leur répartition bien définie est commune aux deux espèces. Même si la présence de tels cristaux dans les graines a déjà été rapportée, leur quantité importante chez *P. douarrei* et *P. baillonii* soulève des questions, en particulier en lien avec la pauvreté avérée des sols ultramafiques en calcium (Tableau 16). Malgré de telles conditions édaphiques défavorables, il y a donc une accumulation notable de cet élément au sein de la graine et l'on peut imaginer que la seule explication avancée jusqu'à présent sur l'existence de tels cristaux chez les plantes et qui serait de constituer un moyen de défense contre la prédation par les herbivores ou les insectes ne suffise pas (Prychid et Rudall, 1999 ; Ilarslan et al., 2001 ; Franceschi et Nakata, 2005). Il est donc tentant d'envisager que ces cristaux permettraient un stockage de calcium utile lors de la germination. En effet, il a été montré l'existence d'une relation entre le calcium intracellulaire et la signalisation par l'acide abscissique (ABA), cette hormone étant connue pour inhiber la germination et intervenir dans la tolérance au stress hydrique (Leung et Giraudat, 1998 ; Fan et al., 2003). Ainsi, Leung et Giraudat (1998) notent que l'une des réponses des cellules de garde à l'action de l'ABA est une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} ce qui induirait la fermeture des stomates. Il y a donc un lien avéré entre la présence de calcium et la signalisation médiée par l'ABA. Cette dernière hormone étant antagoniste des gibbérellines, hormones promotrices de la germination (Côme et Corbineau, 2006 ; Black et al., 2006 ; Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006), le calcium pourrait intervenir directement ou indirectement dans les phénomènes germinatifs des graines de *P. douarrei*.

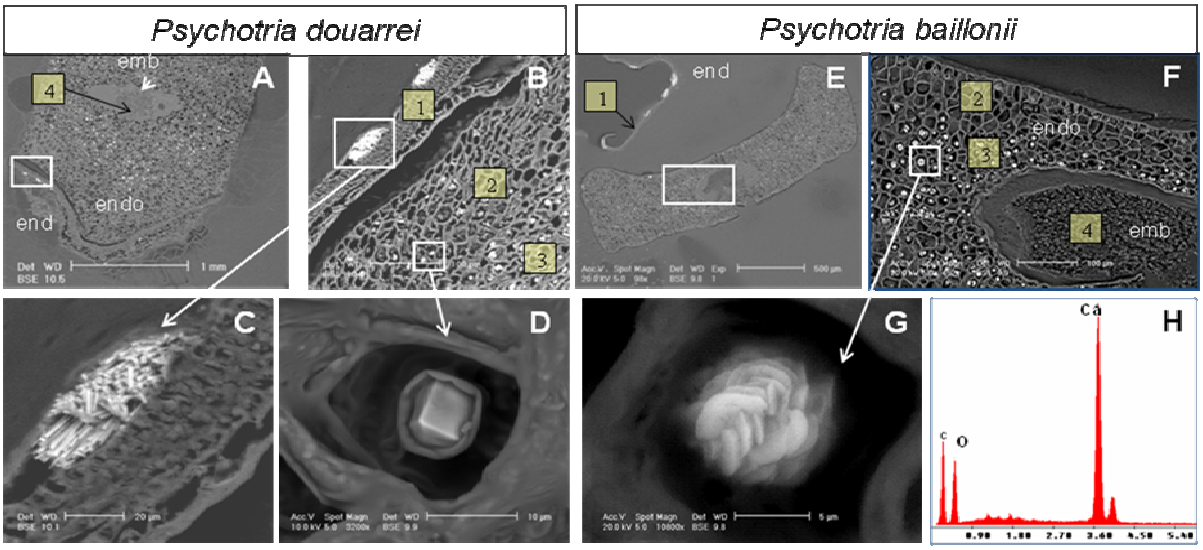


Figure 44 : Scanning electron microscopy observations (BSE images) of *P. douarrei* (A-D) and *P. baillonii* (E-G); A-D: Transverse section of *P. douarrei* seed (A) zoomed on white square part (B) and on calcium oxalate raphide (C) and prismatic (D) crystals; E-G: Transverse section of *P. baillonii* seed (E) zoomed on white part (F) and on calcium oxalate druse crystal (G); H: x-ray analysis of calcium oxalate crystal. Numbered squares indicate the analysed zones (1: within the endocarp, 2: within the outer part of the endosperm, 3: within the inner part of the endosperm, 4: within the embryo). (end: endocarp, endo: endosperm, emb: embryo). (d'après Fogliani et al., in prep.)

Tableau 17 : X ray analyses of calcium oxalate crystals. (d'après Fogliani et al., in prep.)

Analyse number	Raphide crystals		Prismatic crystals		Druse crystals	
	Calcium	Oxygen	Calcium	Oxygen	Calcium	Oxygen
1	20.18%	79.82%	20.99%	79.01%	21.02%	78.98%
2	17.06%	82.94%	20.18%	79.82%	18.04%	81.96%
3	24.60%	75.40%	23.64%	76.36%	19.03%	80.97%
Average	20.61%	79.39%	21.60%	78.40%	19.36%	80.64%
SD Value	3.79	3.79	1.81	1.81	1.52	1.52
Ratio Ca/O	**0.26**		**0.28**		**0.24**	

Values are the means of five replicates.

Plusieurs auteurs ont pu reporter que la formation des cristaux d'oxalate de calcium était régulée génétiquement et que les fonctions de ces derniers étaient étroitement liées à leur forme, leur taille et à leur localisation. Ainsi, concernant nos deux espèces de *Psychotria*, nous avons pu identifier 3 types de cristaux d'oxalate de calcium, des raphides ou aiguilles localisés principalement dans l'endocarpe, élément constitutif du fruit, des formes prismatiques ou en rose des sables dans la partie la plus interne de l'albumen, proche de l'embryon. Cette répartition et la forme des cristaux d'oxalate de calcium semblent indiquer

un rôle de protection des raphides et un rôle de réserve de calcium pour les cristaux en formes de prismes et de rose des sables. Franceschi et Nakata (2005) et Ilarsan et al. (2001) ont pu reporter ces mêmes observations et notamment Ilarsan et al. (2001) concernant des graines en développement de soja.

La quantité importante de cristaux d'oxalate de calcium pourrait alors être expliquée, cependant, Franceschi et Nakata (2005) ont également reporté que les oxalates pouvaient jouer un rôle dans la détoxification de l'aluminium et des métaux lourds en général. L'oxalate peut agir de deux manières, soit, la plante libère de l'oxalate dans l'environnement via les racines, il s'agirait d'un mécanisme d'exclusion, soit, l'oxalate intervient dans des mécanismes de tolérance interne en intervenant dans la séquestration de métaux lourds (Al, Pb, Cd, Cu).

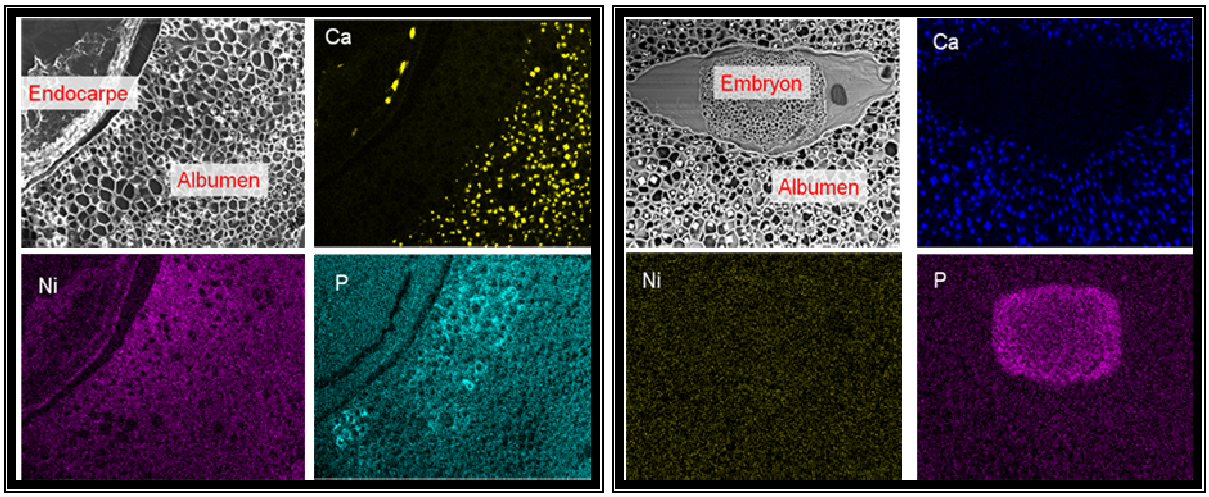


Figure 45 : Cartographies brutes aux rayons x de la répartition des éléments nickel (Ni), calcium (Ca) et Phosphore au sein de l'endocarpe (à gauche), de l'albumen (à gauche et à droite) et de l'embryon (à droite) de *Psychotria douarrei*.

Le second élément apporté par ces observations est la répartition spécifique de certains éléments minéraux. Ainsi, l'élément nickel uniquement présent chez *Psychotria douarrei* se trouve présent en quantité plus importante dans la partie la plus externe de l'albumen dans une zone commune avec l'élément phosphore. Au contraire, l'élément calcium est lui situé dans la zone interne de l'albumen (Figure 45, Figure 46, Figure 47). Cela le positionne dans une zone proche de l'embryon qui lui n'en détient que très peu, alors qu'il contient du phosphore en quantité importante, sa présence étant révélatrice de son intervention dans les processus métaboliques engendrés par la germination.

Concernant l'élément nickel, il est intéressant de noter que ce dernier est présent dans l'embryon en quantité plus faible quasi équivalente à celle de la partie la plus interne de l'albumen. Ce gradient de nickel laisse à penser qu'une stratégie a été mise en place pour protéger l'embryon de l'effet néfaste que pourrait avoir le nickel sur lui avec un véritable rôle de barrière de l'albumen, laissant ainsi penser que le transport de cet élément se fait essentiellement par voie symplastique. Ces observations sont en accord avec ce que Bhatia et al. (2003) ont pu reporter concernant les fruits et semences de *Stackousia tryonii*. Cependant, la présence de nickel en quantité certes plus faible au niveau de l'embryon laisse penser également que ce dernier puisse posséder une tolérance à cet élément et que la voie apoplastique interviendrait également.

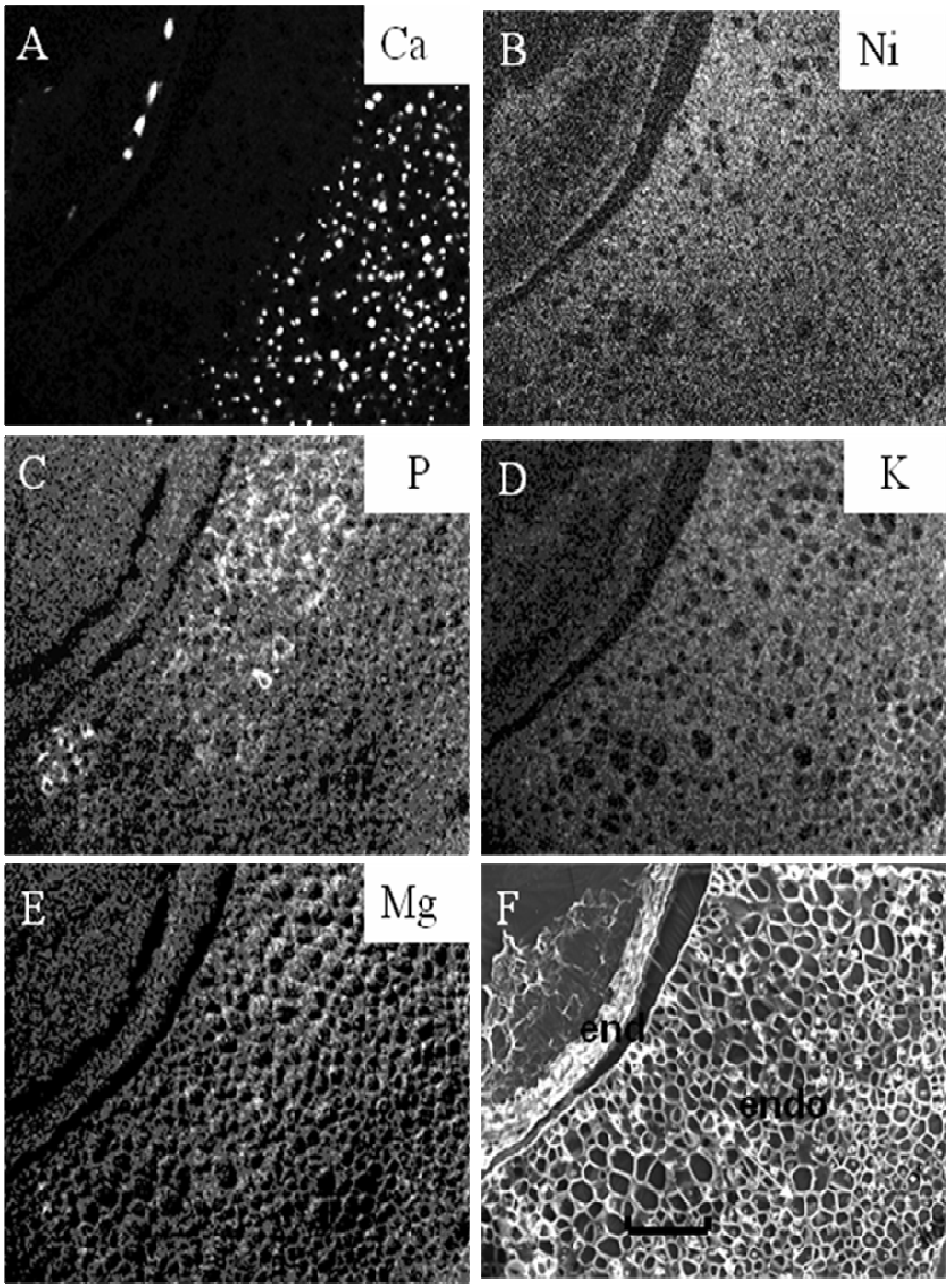


Figure 46 : Micrographs of *Psychotria douarrei* seed transversal section located near the endocarp (end) and the endosperm (endo). A-E: Elemental distribution map of Ca, Ni, P, K, Mg; F: electron micrograph of the seed section. Scale bar = 200µm. (d'après Fogliani et al., in prep.)

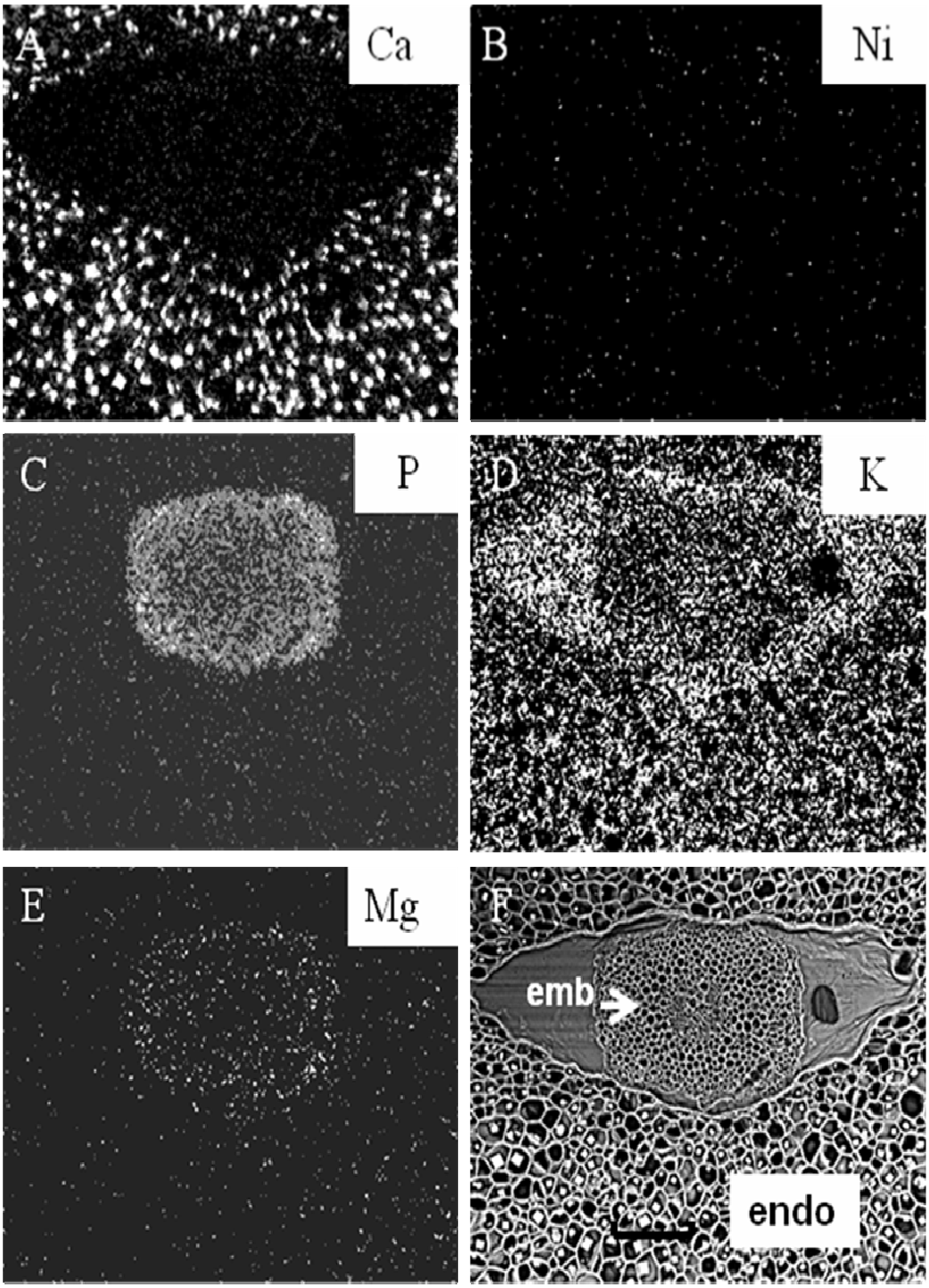


Figure 47 : Micrographs of *Psychotria douarrei* seed transversal section located near the inner part of the endosperm (endo) and the embryo (emb). A-E: Elemental distribution map of Ca, Ni, P, K, Mg; F: electron micrograph of the seed section. Scale bar = 100µm. (d'après Fogliani et al., in prep.)

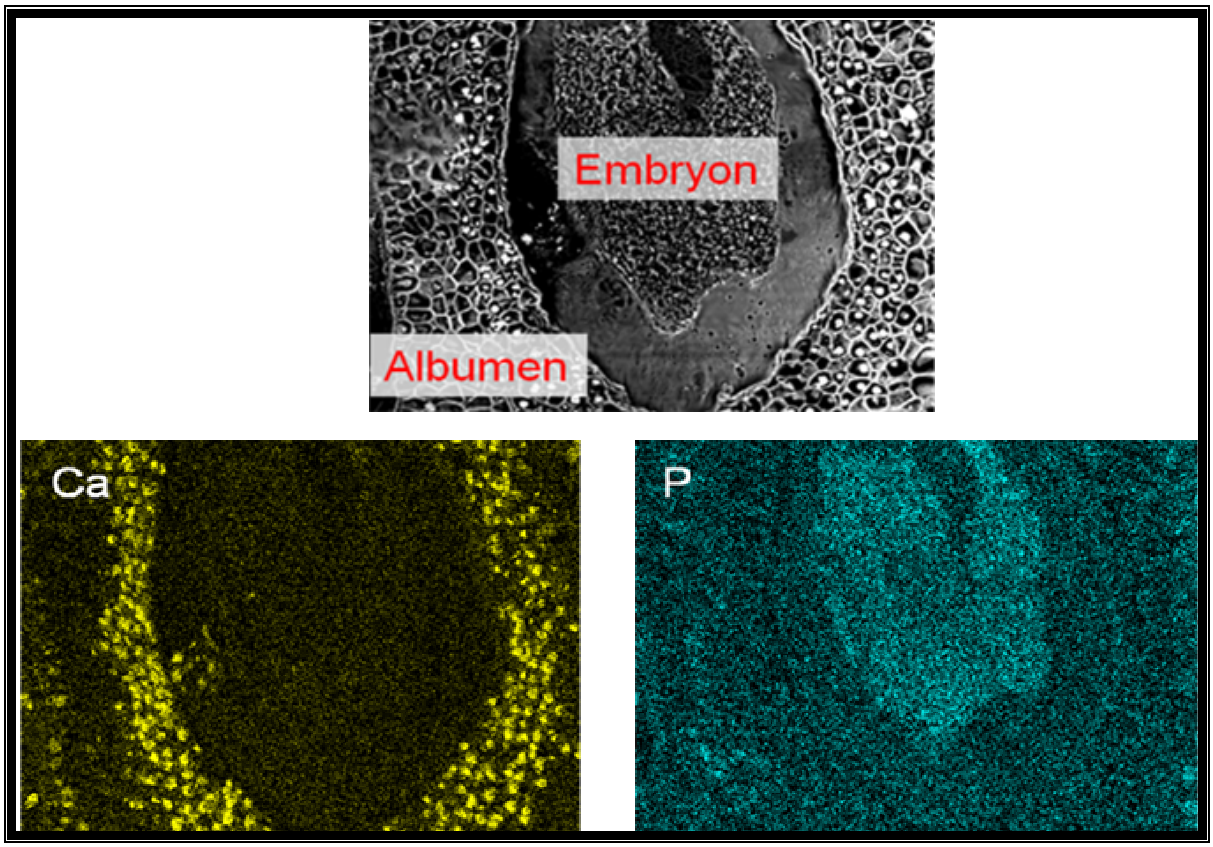


Figure 48 : Cartographie aux rayons x de la répartition des éléments calcium (Ca) et phosphore (P) au sein de l'albumen et de l'embryon de *Psychotria baillonii*.

La même organisation est retrouvée pour le calcium chez *P. baillonii* à savoir dans la partie la plus interne de l'albumen et dans l'endocarpe laissant penser que sa disposition est indépendante de la présence du nickel qui n'est que faiblement détecté chez cette espèce (Figure 48, Figure 49). Concernant l'élément phosphore, sa présence est confirmée dans l'embryon de cette espèce alors qu'il n'est pas spécifiquement visible dans la partie la plus externe de l'albumen. On peut penser que ce positionnement chez *P. douarrei* est étroitement lié à celui du nickel.

La répartition du chlore chez *P. baillonii* présente une spécificité avec une concentration plus importante dans la partie la plus externe de l'albumen qui mérite une attention particulière (Figure 49).

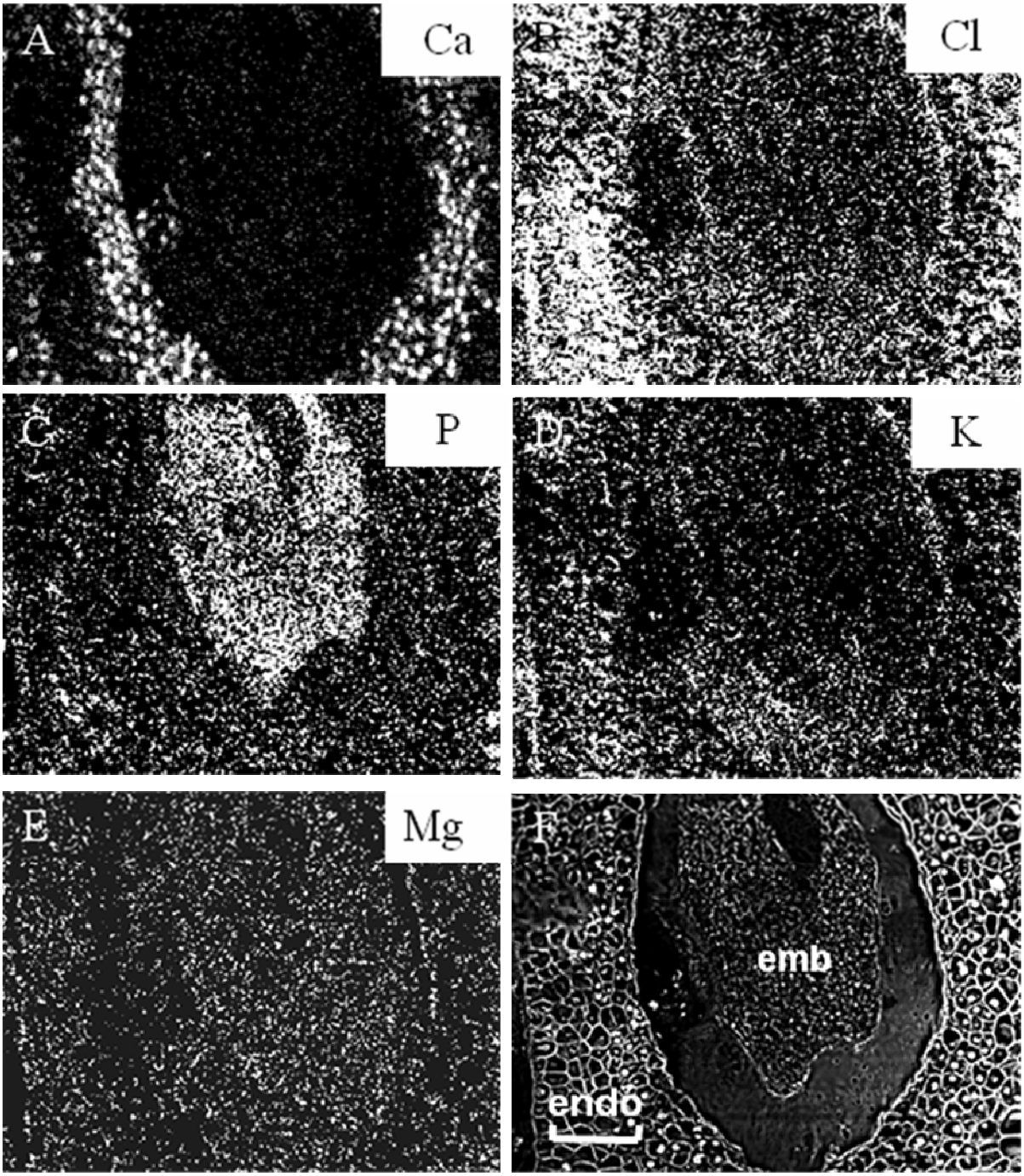


Figure 49 : Micrographs of *Psychotria baillonii* seed transversal section showing endosperm (endo) and embryo (emb). A-E: Elemental distribution map of Ca, Cl, P, K, Mg; F: electron micrograph of the seed section. Scale bar = 100µm. (d'après Fogliani et al., in prep.)

Du petit nombre de travaux conduits sur la répartition des éléments minéraux et notamment du nickel au sein des semences d'espèces hyperaccumulatrices de nickel, beaucoup ont noté l'effet barrière des couches les plus externes de la semence, protégeant ainsi le nouvel individu (embryon). En analysant les éléments minéraux, plus spécifiquement dans la partie externe de l'albumen de *P. douarrei*, partie où le nickel est le plus concentré, on peut noter une étroite corrélation avec différents éléments minéraux, comme le P, K, le Mg et le S. Witkowski et al. (1997) ont également noté ces corrélations concernant les semences de *Burkea africana* et notamment entre l'élément P et le Ni.

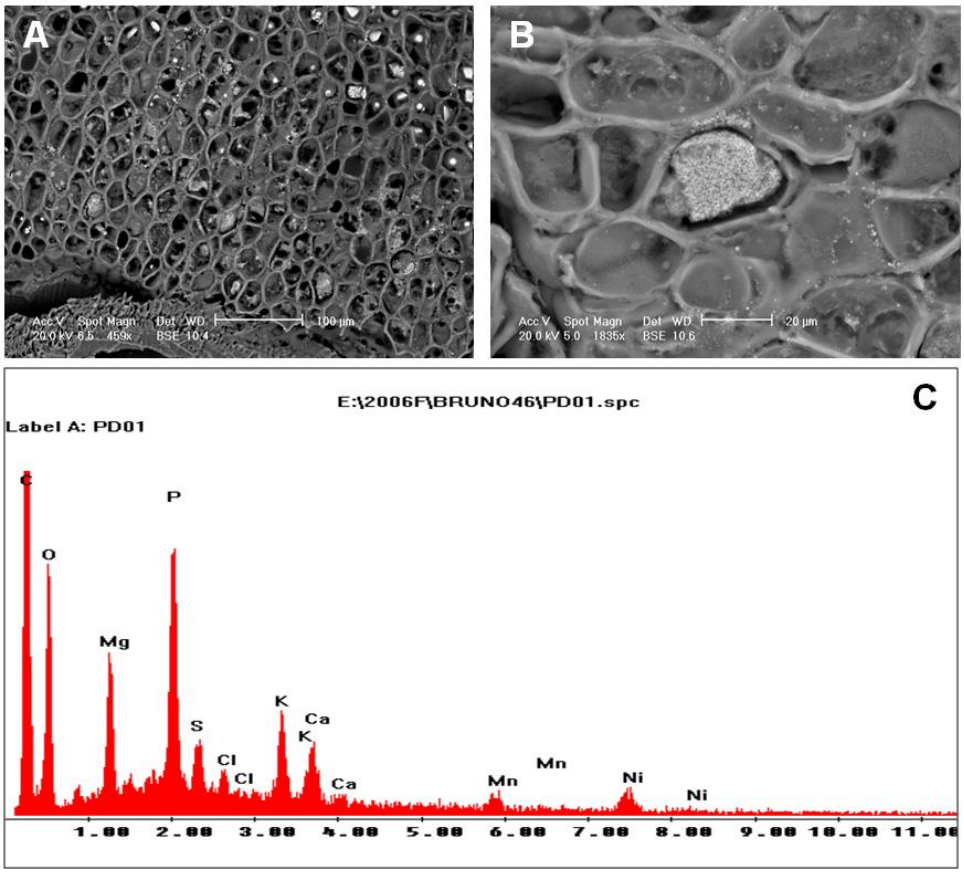


Figure 50 : Micrographs of *Psychotria douarrei* seed transversal section located near the outer part of the endosperm (endo). A: Enlarged view of the considered zone; B: Enlarged view on some cells of the zone showing a particular structure rich in P, Ni, Mg, K and S; C: x-ray analysis analysis of this particular structure (d'après Fogliani et al., in prep.)

Witkowski et al. (1997) et Marschner (1995) notent que la plupart des éléments minéraux des semences sont complexés avec le P sous forme de phytine. Nielsen et Sandstread (1974) ont pu noter que des semences riches en nickel étaient aussi riches en phytine. Vasca et al. (2002) et Vohra et al. (1965) ont pour leur part, montré la stabilité de complexe Ni-phytic acid. La présence de Mg et de K au sein de cette couche de l'albumen

riche en Ni et en P, confirmerait également la présence possible de phytate (Witkowski et al., 1997). Et enfin, la présence importante de l'élément S au sein de cette couche riche en Ni semble indiquer un rôle potentiel de ce dernier dans la spéciation du nickel. En effet, si l'on examine la répartition de l'élément S au travers des différentes parties de la plante de *P. douarrei,* il est intéressant de noter une corrélation entre cette dernière et la répartition du nickel. Ingle et al. (2005) dans une étude protéomique concernant *Alyssum lesbiacum*, une espèce hyperaccumulatrice de nickel ont noté l'intervention du métabolisme du S dans l'appareillage de la plante permettant l'hyperaccumulation du nickel et notamment par l'intermédiaire d'isoforme de O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL) et de la redistribution du S envers le métabolisme de la cystéine.

IV.2/ Caractéristiques minérales des fruits de Psychotria douarrei et Geissois pruinosa ou la découverte de cristaux de sels de nickel.

L'analyse détaillée de la partie pulpeuse du fruit montre la présence de cristaux d'oxalate de calcium en forme de raphides précédemment décrits, ce qui confirme un rôle potentiel de défense de ces derniers puisque étant directement en contact avec l'extérieur et donc, potentiellement soumis à la prédation (Figure 51A, C). L'absence de cristaux d'oxalate de calcium en forme de prisme ou de rose des sables semble également confirmer un rôle de stockage pour la germination qui n'a pas lieu d'être au niveau du fruit.

L'analyse point par point de ces différents cristaux de calcium au niveau de la pulpe du fruit a permis de repérer très fortuitement la présence de nombreux cristaux de petite taille accolés à la paroi cellulaire (Figure 51B). L'analyse au rayon X de ces cristaux a permis de les identifier comme étant des cristaux de sels de nickel (Figure 51D). Ce résultat est inédit et très original. Il est d'autant plus surprenant qu'à notre connaissance, des cristaux de sels de nickel n'ont jamais été retrouvés chez des plantes. Néanmoins, la bibliographie reporte l'existence de cristaux d'oxalate de nickel dihydratés chez *Aspergillus niger* (Magyarosy et al., 2002). Magyarosy et al., (2002) reporte la présence de ces cristaux d'oxalate de nickel autour de la paroi cellulaire et de temps en temps, dans la partie interne de la paroi cellulaire des *Aspergillus niger*. Ces cristaux seraient associés à de la matrice fibrillaire. En ce qui concerne les cristaux présents dans le fruit de *P. douarrei*, ces derniers ne semblent pas être des cristaux d'oxalate, car l'analyse aux rayons x révèle une proportion d'un atome de nickel pour 2 d'oxygène en moyenne, proportion qui est de 1 pour 8 chez l'oxalate de nickel dihydraté.

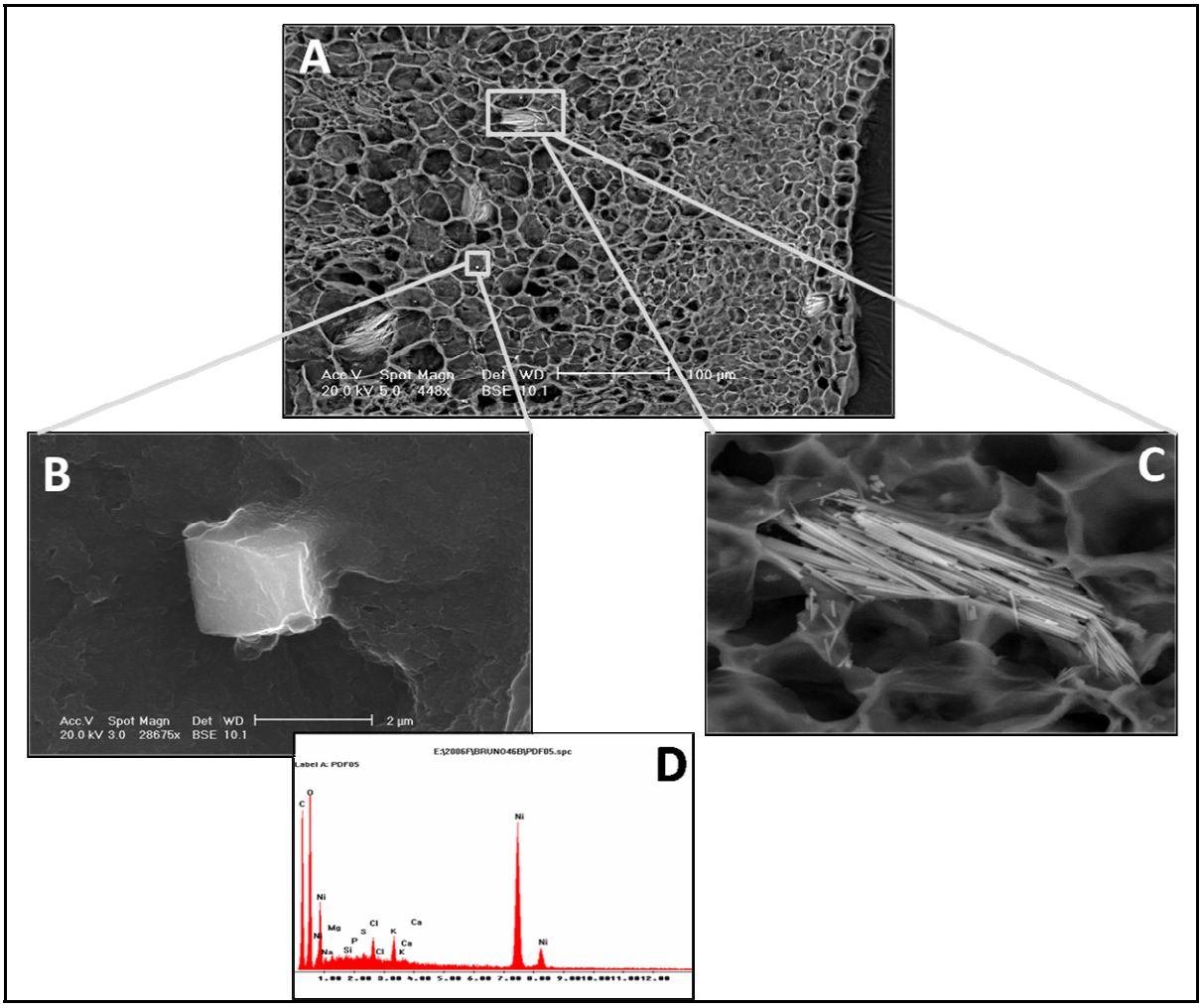


Figure 51 : Observation au microscope électronique à balayage de la pulpe du fruit de *P. douarrei* et analyse aux rayons x des cristaux apparents. A : Agrandissement de la pulpe du fruit; B : Agrandissement d'un cristal de sel de nickel ; C : Agrandissement de cristaux d'oxalate de calcium (raphides) ; D : Analyse aux rayons x du cristal de sel de nickel.

Dans l'objectif de déterminer la structure cristalline de ces cristaux, nous avons tenté de les extraire pour une analyse au diffractomètre aux rayons X. En effet, l'analyse réalisée en microscopie électronique à balayage ne le permet pas pour plusieurs raisons. La première réside dans le fait que l'échantillon est carboné et qu'il est donc impossible de mesurer la proportion de cet élément. La deuxième est due au fait que le faisceau d'analyse passe obligatoirement par la structure qui englobe ce cristal faussant ainsi le résultat qui n'est plus propre au cristal. Malheureusement, nos tentatives de caractérisation de ces cristaux restent aujourd'hui vaines car les cristaux ont tendance à se solubiliser lors des tentatives d'extraction.

Forts de ces observations au niveau du fruit, une analyse renouvelée des graines nous a conduits à y retrouver ces cristaux de sels de nickel. Ils se retrouvent dans les structures les plus externes de la graine, dans la partie la plus externe de l'albumen (Figure 52C) mais aussi au niveau du tégument (Figure 52D, E). Ils apparaissent là encore clairement emballés dans une structure membranaire mise en évidence par comparaison entre les clichés en mode SE et BSE (Figure 52D, E).

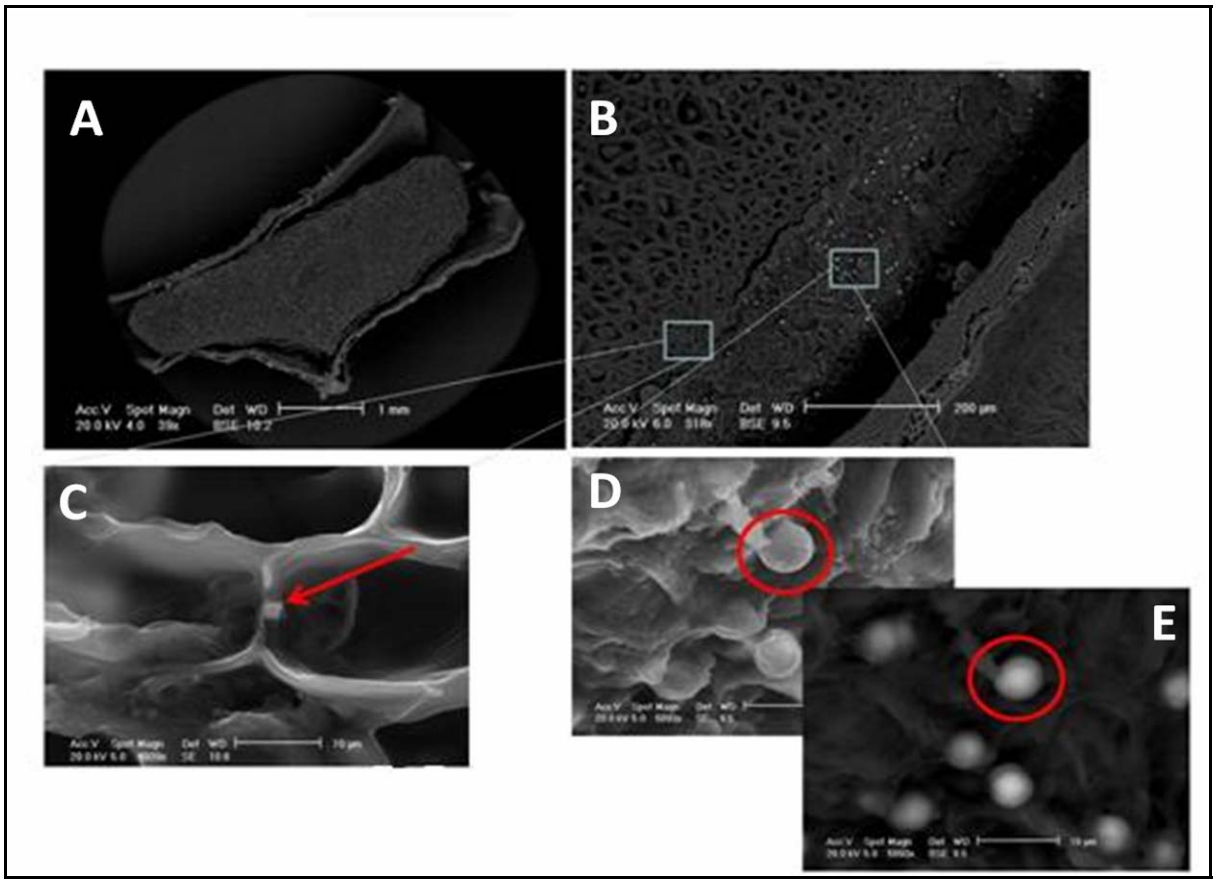


Figure 52 : Observation au microscope électronique à balayage de la partie externe de la graine de *P. douarrei*. A : Vue d'ensemble d'une coupe transversale de graine (endocarpe inclus); B : Agrandissement de la zone endocarpe-albumen; C : Localisation des cristaux de sel de nickel au niveau de la paroi des cellules externes de l'albumen; D, E : Agrandissement des cristaux de sel de nickel au niveau du tégument observés en mode SE (D) ou BSE (E).

Magyarosy et al. (2002) notent que la capacité à bioaccumuler et à précipiter le nickel est basée sur un mécanisme actif nécessitant l'intervention du métabolisme énergétique et non simplement une biosorption. La concentration importante de l'élément P au sein de la partie riche en nickel (partie la plus externe de la graine de *Psychotria douarrei*) (Figure 49) étaie cette possibilité concernant ce mécanisme. Il est à noter que les analyses aux rayons x sur les cristaux de sels de nickel dans la zone du tégument et de l'albumen ne révèlent pas les mêmes

proportions d'atomes de nickel et d'oxygène. En effet, ces proportions sont de 1 Ni pour 1 O pour les cristaux du tégument qui présentent en apparence une forme moins cubique que ceux de l'albumen (ou du fruit) qui fournissent une proportion de 1 Ni pour 4 O. Il convient donc de poursuivre les travaux concernant l'étude de ces cristaux.

La position des différents cristaux de sels de nickel dans le fruit et dans les parties les plus externes de la graine semble en accord avec la présence d'un gradient décroissant de nickel depuis l'extérieur du fruit jusqu'à l'intérieur de la graine. Ils sont en effet situés dans les parties caractérisées par cartographie au MEB (Figure 49, Figure 53) et analyses ICP (Tableau 16), comme étant les plus riches en nickel. Par ailleurs, l'analyse par cartographie de la partie charnue du fruit incluant exocarpe et mesocarpe confirme ce gradient marqué du nickel de l'extérieur vers l'intérieur. Contrairement à la graine, ce gradient n'est pas corrélé avec l'élément phosphore, seul l'élément K semble avoir une distribution similaire (Figure 53).

Dans l'objectif de rechercher si les caractéristiques citées ci-dessus sont une spécificité de *Psychotria douarrei*, un travail similaire a été mené sur une autre espèce hyperaccumulatrice de nickel. Ainsi, les fruits et les graines de *Geissois pruinosa*, une espèce de la famille des Cunoniaceae, ont été observés et analysés selon la même méthode et le même déroulement que pour *Psychotria douarrei*. Il est à noter que les taux de nickel détectés dans les feuilles de cette espèce sont moindres de l'ordre de 10000 ppm soit 2 à 2.5 fois plus faible que *P. douarrei*.

Chez *G. pruinosa*, les infrutescences obtenues après fécondation des inflorescences sont des grappes de fruits organisées de manière étagée, chaque étage étant représenté par un verticille de 3, 4 ou 5 fruits. Le fruit est une capsule cylindrique, vert quand jeune tournant au rouge puis finalement brun à maturité, à déhiscence septicide depuis l'apex (Figure 54A).

L'analyse des fruits de *G. pruinosa* montre la présence de cristaux de sel de nickel similaire à ceux retrouvée chez *Psychotria douarrei*, ces cristaux sont situés dans le mésocarpe du fruit de *G. pruinosa* (Figure 54B). Ces derniers ont été aussi localisés comme pour *P. douarrei* au niveau des parois cellulaires (Figure 54C). Néanmoins, les cristaux ne sont pas aussi abondants que ceux observés chez *P. douarrei*.

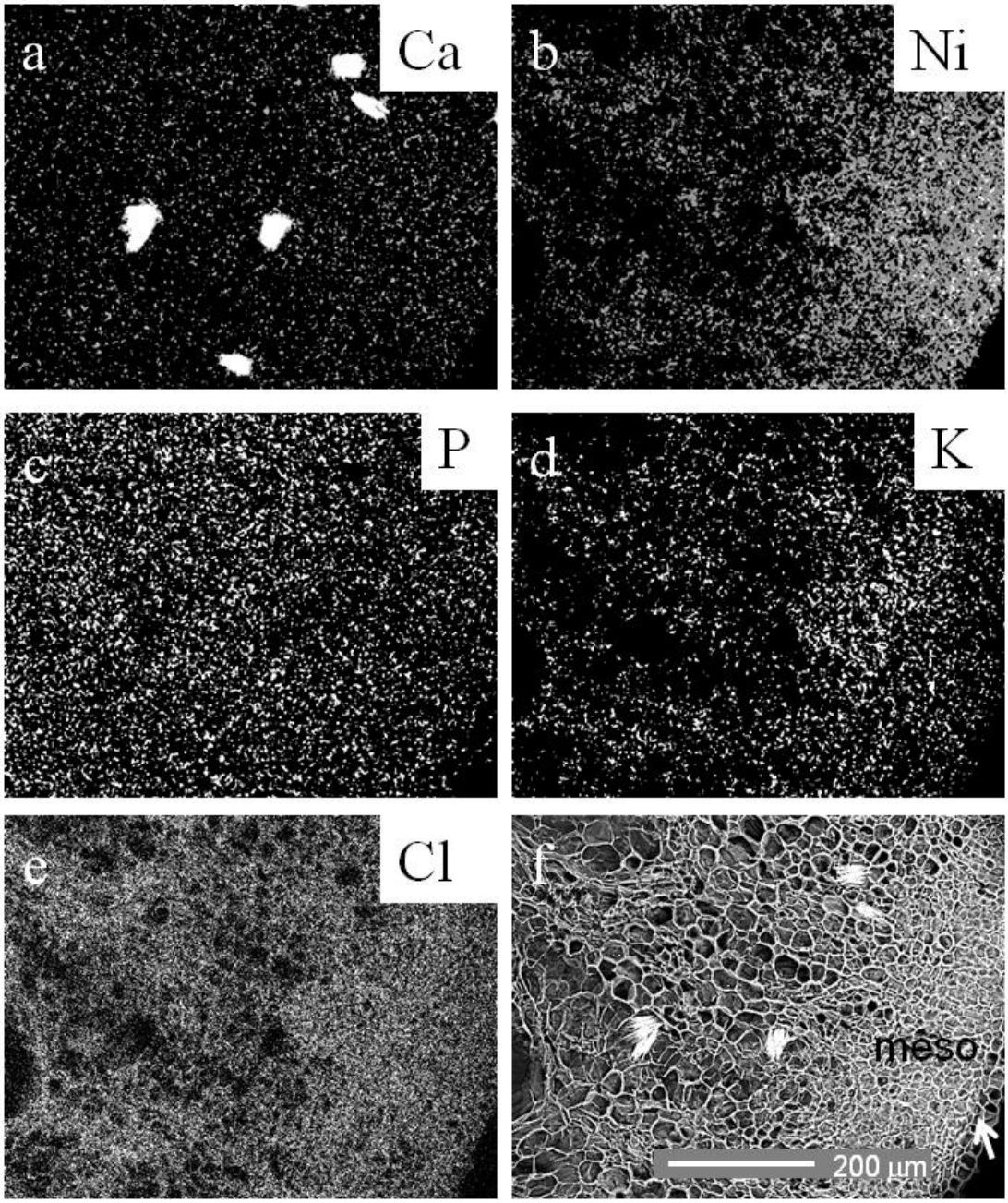


Figure 53 : Micrographs of *Psychotria douarrei* fruit transversal section a-e: Elemental distribution map of Ca, Ni, P, K, Cl; F: electron micrograph of the fruit section. Scale bar = 200µm. (meso : msesocarp ; arrow indicates the exocarp)

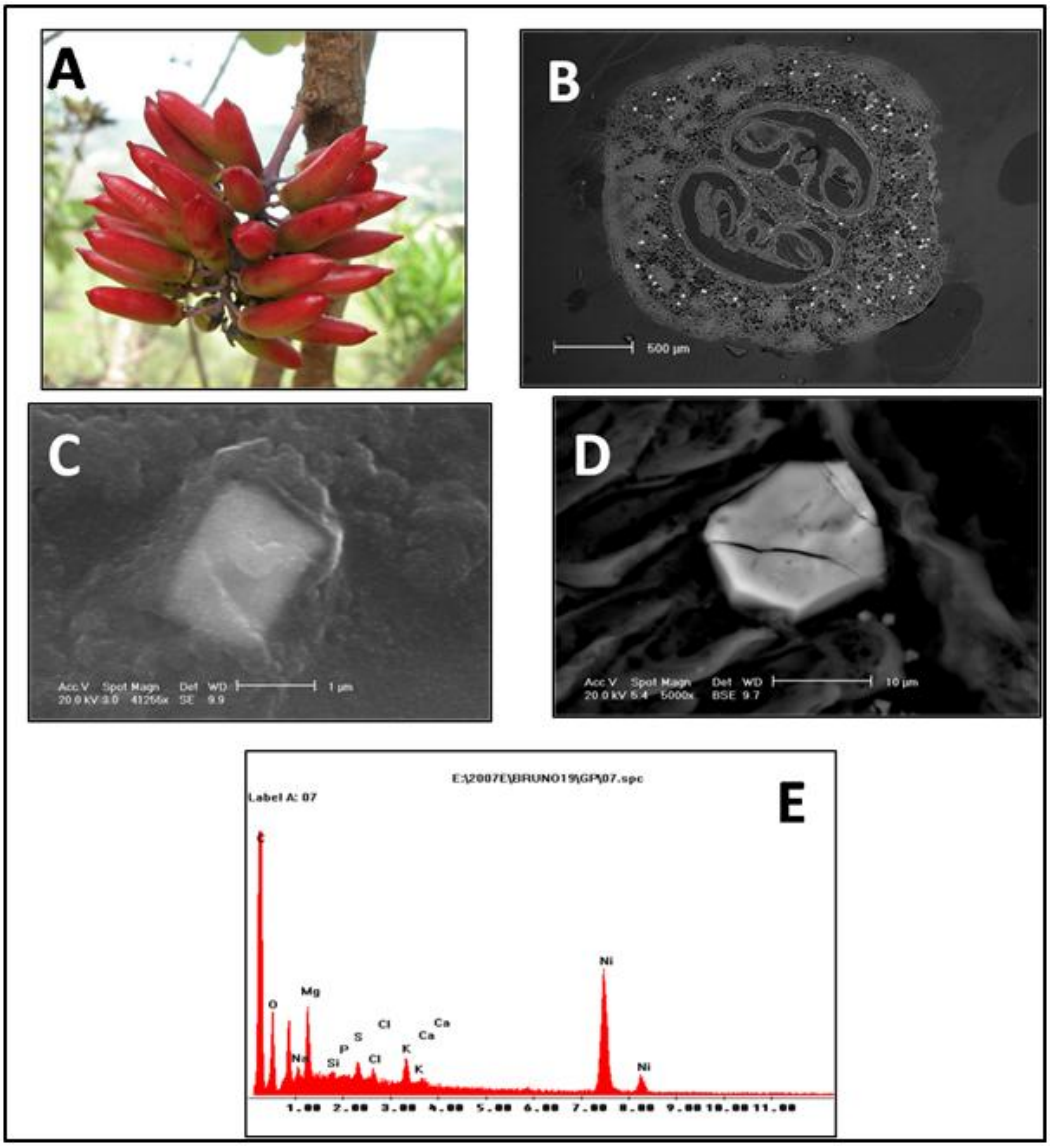


Figure 54: Observation au microscope électronique à balayage du fruit de *Geissois pruinosa* et analyse au rayon X des cristaux apparents. A : Fruits de *Geissois pruinosa* ; B : Coupe transversale de fruit de *Geissois pruinosa* observée au MEB ; C : Agrandissement d'un cristal de sel de nickel localisé dans le mésocarpe, D : Agrandissement de cristaux d'oxalate de calcium en forme de prisme, E : Analyse au rayon X du cristal de sel de nickel.

Plus encore, les cristaux de sel de nickel n'ont pas été repérés au niveau de la graine contrairement à *P. douarrei*. Dans tous les cas, des cristaux de sel de nickel ont été repérés et il semble donc que ces espèces hyperaccumulatrices de nickel aient la capacité et l'outillage nécessaire à une biominéralisation et un stockage du nickel sous cette forme. On peut noter que des résultats beaucoup plus récents ont également permis de localiser de tels cristaux chez une autre espèce hyperaccumulatrice, en l'occurrence *Phyllanthus favieri* (données non exposées.

La présence de cristaux d'oxalate de calcium en forme de prisme au sein du mésocarpe et de l'endocarpe du fruit diffère de ceux retrouvés chez *P. douarrei*. La structure du fruit pourrait expliquer cette différence, en effet, le fruit de *P. douarrei* est une drupe tandis que le fruit de *G. pruinosa* est un follicule. Ainsi, la présence de cristaux d'oxalate de calcium de type prisme peut alors apporter un avantage dans la dureté et la robustesse de ce dernier qui serait moins soumis à l'herbivorie.

Les cristaux d'oxalate de calcium diffèrent aussi de ceux retrouvés chez *P. douarrei* par leur localisation au sein de la graine (Figure 55). En effet, ces derniers ne sont présents qu'au niveau des téguments. Par contre, la localisation de l'élément phosphore semble être similaire à ce que l'on a pu noter concernant les semences de *P. douarrei*, à savoir, une concentration toute particulière dans la zone de l'albumen et de l'embryon (Figure 55) en lien certainement avec son utilisation au cours de la germination.

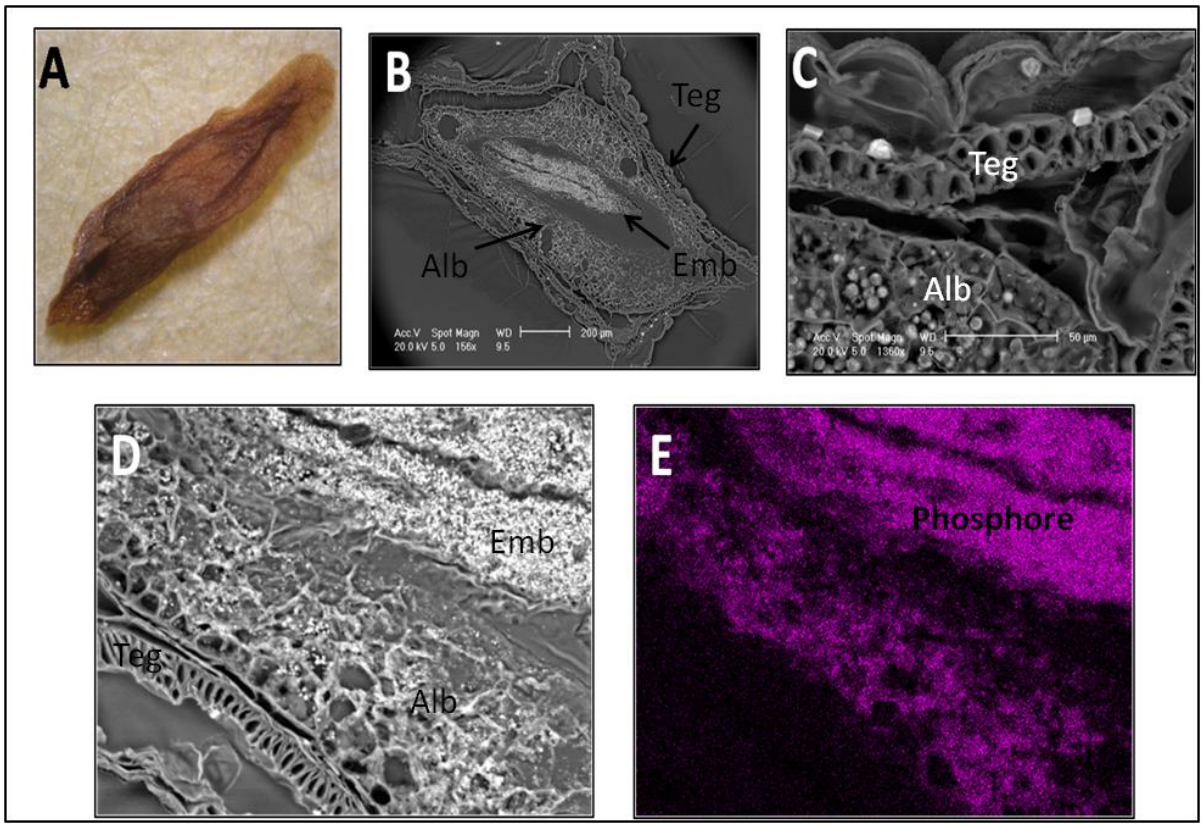


Figure 55 : Observation au microscope électronique à balayage de la graine de *Geissois pruinosa*. A : Graine de *Geissois pruinosa* ; B : Coupe longitudinale de la graine de *G. pruinosa* observé au MEB ; C : Agrandissement de la zone tégument-albumen de *G. pruinosa* ; D : Zone définissant le tégument, l'albumen et les deux cotylédons de la graine de *G. pruinosa* ; E : Répartition du phosphore au sein de la zone définit en D.

V/ Etude protéomique des graines de *P. douarrei*

Les résultats obtenus dans cette partie font l'objet d'une publication en cours de rédaction : «Proteome wide analysis of *Psychotria douarrei* seeds reveals novel mechanisms of Nickel hyperaccumulation in endemic plants of New-Caledonia». Zongo C, Job C, Le Pessot L, Strub JM, Van Dorsselaer A, Job D, Fogliani B.

V.1/ Introduction

Le terme PROTEOME désigne l'ensemble des PROTéines exprimées par le génOME d'une cellule ou d'un tissu, à un moment et dans un environnement donnés (stress, température, prolifération, différenciation…). Le concept est apparu en 1995 (Wasinger et al., 1995). Il désigne l'ensemble des produits des gènes fonctionnels d'un organisme vivant. L'analyse du protéome (protéomique) consiste en la caractérisation de l'ensemble des protéines et de leurs modifications s'exprimant dans un tissu ou un organisme donné à un moment donné ainsi que leur niveau d'accumulation. C'est donc un outil puissant pour déterminer le rôle fonctionnel des gènes et de leurs produits, complémentaire de l'analyse des transcrits. Cependant, cet outil présente quelques limitations, dont l'une réside dans le fait que les protéines ne peuvent faire l'objet d'amplification quantitative, contrairement aux acides nucléiques (réactions de polymérisation en chaîne, PCR) qui représente une étape importante de l'analyse du transcriptome. Toutefois, les progrès technologiques en termes d'extraction, de séparation et d'identification des peptides et des protéines permettent aujourd'hui de caractériser de nombreuses protéines, même celles qui sont très faiblement représentées.

Grâce à d'importantes avancées en termes de séquençage des génomes, à la constitution de nombreuses banques d'ESTs (expressed sequence tag) chez de nombreuses espèces végétales modèles (*Arabidopsis*, riz, *Medicago truncatula*, peuplier, *Physcomitrella patens*) ou d'intérêt agronomique (maïs, blé, orge, soja,…) et le développement de méthodes analytiques (électrophorèse bidimensionnelle, chromatographie, spectrométrie de masse) pour la séparation et la caractérisation des protéines (Chevalet et al., 1998 ; Santoni et al., 1999 ; Hirano et al., 2004 ; Newton et al., 2004), l'analyse protéomique est devenue un élément fondamental en génomique fonctionnelle permettant une analyse des séquences peptidiques prédites à partir des génomes et déposées dans les bases de données (AGI, 2000 ; Goff et al., 2002 ; Yu et al., 2002 ; Li WW et al., 2003 ; Gutiérrez et al., 2004 ; Sarnighausen et al., 2004

; Stauber et Hippler, 2004 ; Zhang et al., 2004 ; Giavalisco et al., 2005 ; **http://www.tigr.org/tdb/tgi/plant.shtml/** ; **http://mips.gsf.de/proj/sputnik/**).

Il existe deux grands types d'approches protéomiques utilisés pour étudier le développement des plantes (Baginsky et Gruissem, 2004). Le premier, défini sous le terme anglais de protéomique «shotgun», est une approche de «protéomique descriptive» qui consiste à établir la liste exhaustive des protéines présentes dans un organe, un tissu ou un organite donné. L'autre type d'approche consiste à caractériser de façon plus ciblée les protéines spécifiques d'un processus de développement donné. Ce type d'approche dite de «protéomique fonctionnelle» a pour but d'identifier des protéines soumises à des modifications post-traductionnelles ou dont le niveau d'accumulation varie au cours d'un processus de développement ou de différenciation. Ceci permet de donner une dimension fonctionnelle à l'analyse protéomique pour expliquer (et non simplement décrire) des processus biologiques complexes. La méthodologie se base aujourd'hui encore principalement sur l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE), qui est une technique robuste utilisée depuis plus de 30 ans par les biochimistes (O'Farrell, 1975).

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE), décrite par O'Farrell (1975), est une méthode combinant deux séparations séquentielles en gel de polyacrylamide :

i) la première correspond à une séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pI) dans un gel contenant un gradient de pH immobilisé réalisé par coulage de solutions d'Immobilines co-polymérisant avec le gel d'acrylamide (Bjellqvist et al., 1982). Les protéines soumises à un champ électrique constant migrent dans le gel jusqu'à la position où le pH du milieu est égal au pI de la protéine pour laquelle sa charge globale est nulle ;
ii) la seconde dimension correspond à une séparation en SDS-PAGE. Entre les deux se situe une étape dite d'équilibration des gels d'isoélectrofocalisation qui permettra aux polypeptides de se charger en SDS. Dès lors, les molécules sont séparées en fonction de leur masse apparente. Les spots sont ensuite révélés par différentes colorations (nitrate d'argent ou bleu de Coomassie). Très résolutive, l'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer des protéines entre 0,03 unités de pH et 1 kDa (Wildgruber et al., 2000).

La graine est un organe approprié pour l'analyse protéomique. C'est en effet un formidable lieu de stockage et sa teneur en protéines peut être très élevée. Une étude protéomique fondamentale déjà citée plus haut est l'étude entreprise par Rajjou et al. (2004). En effet, cette étude montre que l'approche protéomique permet de révéler des éléments fondamentaux de la germination puisque celle-ci peut se dérouler en absence de transcription *de novo*.

Sur ces bases, nos objectifs sont de caractériser le protéome de la graine sèche de l'hyperaccumulateur *P. douarrei* et d'appréhender les mécanismes développés par ces dernières lors de la phase de germination en réponse à différentes concentrations de nickel.

Notre étude a révélé plus de six cents protéines de la graine mature de *P. douarrei*, ainsi que leur accumulation différentielle dans l'albumen et l'embryon, ou au cours de la germination en présence de diverses concentrations de nickel. Il convient de préciser que l'étude, initiée il y a un an, est toujours en cours actuellement, notamment au niveau de l'interprétation biologique fine des mécanismes mis en jeu. Les conditions extrêmes du milieu ultramafique et notamment sa concentration importante en nickel semblent avoir conduit à la mise en place de nombreuses et variables réponses originales du métabolisme des protéines des graines de *P. douarrei*. Ainsi, du fait de cette très grande variabilité et de cette très grande originalité du protéome, les résultats provenant des analyses en spectrométrie de masse sont particulièrement difficiles à obtenir et interpréter. De plus, notre analyse met en évidence le rôle de protéines nouvelles jamais décrites chez les graines (Rajjou et al., 2004 ; Catusse et al., 2008) ou chez les plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds (Verbruggen et al., 2009). Toutefois, nos premiers résultats nous permettent déjà d'entrevoir des pistes intéressantes et originales concernant les mécanismes adaptatifs développés par les graines en réponse aux conditions édaphiques du milieu ultramafique durant les phases de maturation et de germination.

V.2/ Test de germination en présence de différentes concentrations de nickel

Des répétitions de 4×25 graines de *P. douarrei* isolées de l'endocarpe sont déposées face bombée au dessus dans des boîtes de Pétri contenant des cotons hydrophiles imbibés d'eau ou d'une solution d'acétate de nickel. Quatre concentrations en nickel sont préparées

(10 ppm, 50 ppm, 75 ppm et 100 ppm) à partir d'acétate de nickel. A cette fin, pour 500 mL d'une solution d'acétate de nickel, on pèse :

-21,2 mg d'acétate pour 10 ppm de nickel (soit 5 mg de Ni)

-106 mg d'acétate pour 50 ppm de nickel (soit 25 mg de Ni)

-159 mg d'acétate pour 75 ppm de nickel (soit 37,5 mg de Ni)

-212 mg d'acétate pour 100 ppm de nickel (soit 50 mg de Ni)

La germination d'*A. thaliana* (espèce non tolérante au nickel) a aussi été évaluée dans les mêmes conditions afin de comparer cette dernière avec la germination des graines de *P. douarrei*. Les graines sont directement disposées sur une membrane de cellulose quadrillée et imbibées de 1,3 mL de solution. Le suivi de germination s'effectue en comptant le nombre de graines germées (percée radiculaire de 1 mm) toutes les deux heures pour *A. thaliana* et tous les jours pour *P. douarrei*.

L'extraction des protéines sur graines germées est effectuée seulement pour des concentrations en nickel de 10 ppm et 75 ppm. Lorsque 1% des graines ont germées, toutes les graines sont prélevées et broyées afin de procéder à l'extraction protéique (Figure 56).

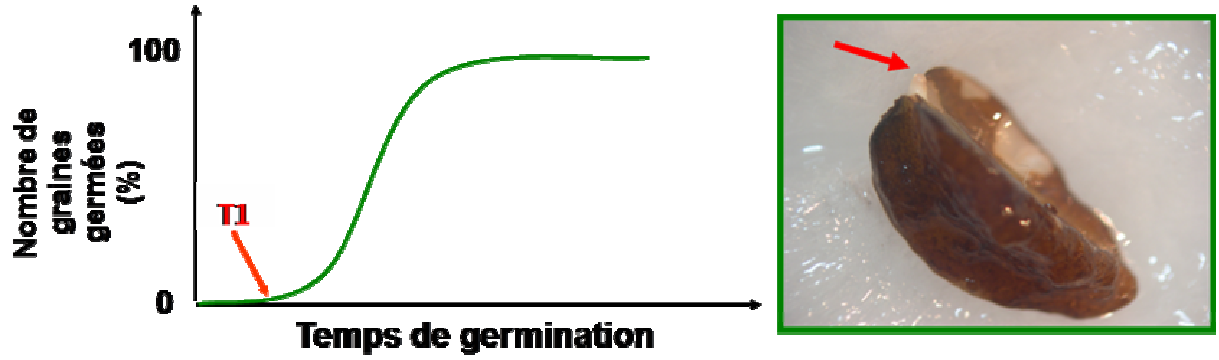


Figure 56 : Courbe théorique de la germination d'une graine (Côme, 1982) et graine de *P. douarrei* germée. (La flèche rouge indique la percée radiculaire). Le temps T_1 indique le temps pour atteindre 1% de germination. Ce temps T_1 est pris comme valeur limite supérieure de la phase de germination *stricto sensu.*

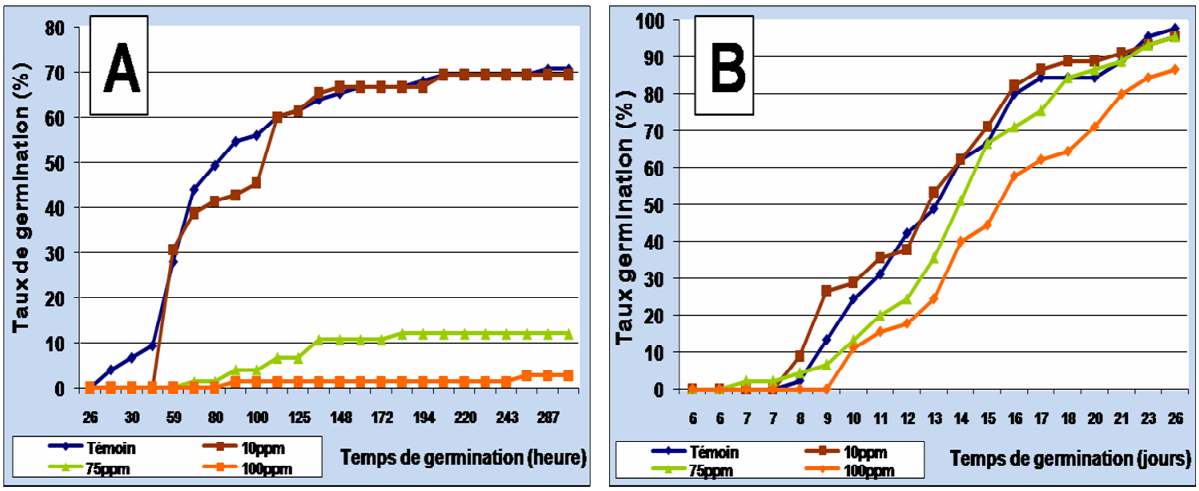


Figure 57 : Courbes de germinations cumulées des graines d'*A. thaliana* (A) et de *P. douarrei* (B) en fonction de différentes concentrations d'acétate de nickel

Les résultats montrent une grande sensibilité des graines d'*A. thaliana* aux fortes concentrations en acétate de nickel (Figure 57). La concentrations de 10 ppm d'acétate de nickel montrent une vitesse de germination similaire au témoin. Cependant, une teneur en acétate de nickel de 75 ppm rend la germination des graines d'*A. thaliana* difficile et une teneur de 100 ppm l'inhibe complètement.

Concernant les graines de *P. douarrei*, on peut noter que, contrairement aux graines d'*A. thaliana*, leur germination est très peu affectée par la présence de nickel, quelle que soit sa concentration. Ces résultats montrent clairement, pour la première fois, la tolérance de la graine de *P. douarrei* aux concentrations fortes de nickel durant la phase de germination.

V.3/ Etude du protéome des graines matures sèches de P. douarrei

- **Dosage des protéines**

L'extraction des protéines sur la graine entière est réalisée à partir de 50 graines soit environ 1,8 g de matière fraîche. Pour l'albumen et l'embryon, elle est effectuée sur, respectivement, 30 graines soit environ 41 mg de matière et 60 graines soit environ 18 mg de tissu. Le dosage est effectué en triplicat sur chaque échantillon. Des concentrations différentes sont prises afin de vérifier la linéarité du dosage.

Tableau 18 : Résultats du dosage pour les extractions de protéines sur la graine entière

	Concentration (µg/µL)	Quantité (µg de protéines/mg de graines)
Albumines	6,16	13,69
Globulines	1,87 (5,61)	4,1 (12,4)
Prolamines	0,36	0,03
Glutélines	3,02	0,67

Les valeurs en bleu représentent le résultat obtenu avec le dosage. Cette valeur semble être sous estimée en regard des valeurs reportés entre parenthèses et qui correspondent aux valeurs estimées à partir du dosage des différents tissus de la graine (albumen, embryon) après séparation.

D'après le dosage (

Tableau 18), les albumines apparaissent en quantité majoritaire sur la graine entière. Les globulines sont aussi présentes en quantité non négligeable. Les prolamines et les glutélines sont en quantités très faibles dans la graine entière, c'est la raison pour laquelle ces fractions ne seront pas analysées au niveau de l'albumen ni de l'embryon.

Tableau 19 : *Résultats du dosage des extractions de protéines sur albumen et embryon*

		Concentration (µg/µL)	Quantité (µg de protéines/mg de tissus)
Albumines	**Albumen**	5,4	148
	Embryon	1,83	11
Globulines	**Albumen**	4,08	212
	Embryon	1,95	11

On note une quantité importante d'albumines dans l'albumen, à hauteur de 148 µg/mg de tissus.

- **SDS-PAGE et protéome de la graine entière**

Afin d'obtenir une bonne résolution et une bonne coloration des bandes des gels SDS-PAGE, plusieurs quantités de protéines ont été testées pour chaque échantillon. Les quantités retenues sont les suivantes :

MT = Marqueurs de taille 5 µL
1 = Albumines de la graine entière 10 µg
2 = Globulines de la graine entière 5 µg
3 = Prolamines de la graine entière 3 µg
4 = Glutélines de la graine entière 5 µg

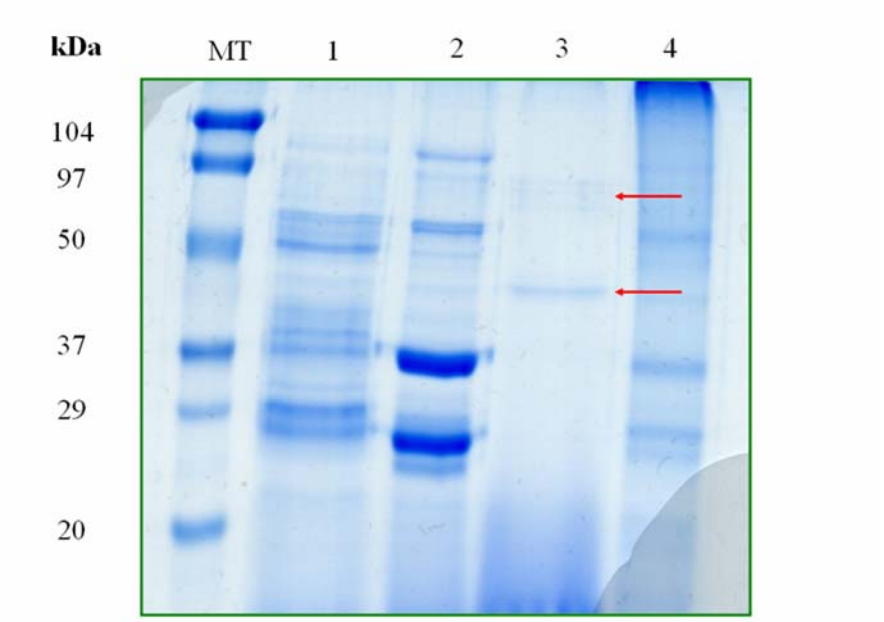


Figure 58 : Electrophorèse SDS-PAGE des quatre familles de protéines de la graine entière sèche de *P. douarrei*

L'électrophorèse a permis de vérifier et corriger les valeurs obtenues par dosage. Ainsi, la concentration en globulines semblait largement sous-estimée (Figure 58, piste 2). L'observation de la piste 2 correspondant aux globulines tend à estimer une quantité trois fois plus importante. Pour la fraction des prolamines (Figure 58, piste 3), une bande apparaît aux alentours des 45 kDa et trois autres bandes apparaissent entre 50 et 97 kDa. Mais une réserve doit être émise du fait qu'il pourrait s'agir d'une «contamination» par les fractions albumines ou globulines. En effet, les prolamines sont des protéines que l'on retrouve généralement chez les céréales et non chez les dicotylédones (Catusse, 2007).

- **Protéome de la graine entière sèche de *P. douarrei***

Les différentes fractions protéiques (albumines, globulines, prolamines et glutélines) ont ensuite été analysées en électrophorèse 2-DE afin d'obtenir les différents gels de son protéome de référence (Figure 59).

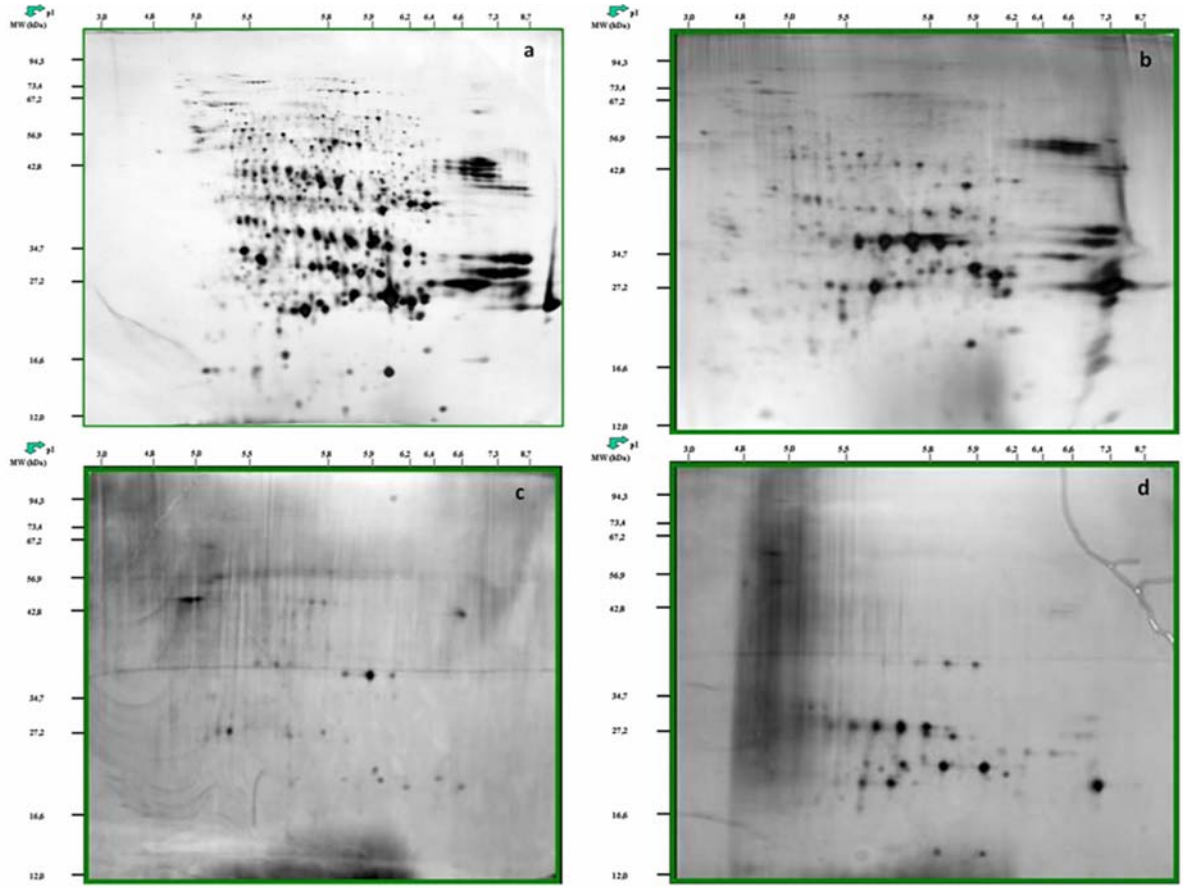


Figure 59 : Protéome de la graine entière sèche de *P. douarrei*. a : fraction albumine, b : fraction globuline, c : fraction prolamine, d : fraction glutéline

La fraction des albumines possède le plus grand nombre de spots détectés avec 608 spots. Au niveau des globulines, 43 spots sont spécifiques, et un nombre important de spots sont communs aux albumines (Figure 59). Pour les prolamines et les glutélines, 51 et 61 spots sont respectivement détectés mais ces derniers ne paraissent pas spécifiques. Au final, 763 spots constituent le protéome de la graine entière de *P. douarrei* (Figure 59) dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. L'excellente qualité des données de masse générées par le laboratoire de Jean-Marc Strub et d'Alain Van Dorsselaer à Strasbourg a largement contribué au succès de l'identification de nos protéines.

Par la suite, du fait de l'importance de la fraction albumine et du fait qu'on s'attend à trouver la quasi-totalité des protéines du métabolisme au sein de la fraction albumine, cette dernière sera privilégiée afin de poursuivre l'étude protéomique dans les différentes conditions (tissulaire, effets du nickel sur la germination) menées.

Afin de faciliter l'interprétation des résultats, nous avons utilisé une classification ontologique des gènes qui permet de classer les protéines identifiées selon les grandes catégories fonctionnelles auxquelles elles appartiennent. Dans une étude protéomique portant sur les graines de betterave à sucre, Catusse et ses collaborateurs ont comparé plusieurs classifications ontologiques décrites dans la littérature et en ont tiré la conclusion que celle de Bevan et al. (1998), proposée lors de la publication du séquençage génomique d'*A. thaliana*, était la plus riche et la plus exacte pour décrire des phénomènes complexes tels que le développement des graines et en extraire des caractéristiques d'expression du protéome qui puissent orienter vers des analyses plus approfondies (Catusse, 2007 ; Catusse et al., 2008). Dans cette classification, quinze classes fonctionnelles ont été attribuées aux gènes de plantes sur la base de la classification ontologique des gènes de la levure (Mewes et al., 1997) et adaptée pour les plantes (Tableau 20).

Tableau 20 : Catégories fonctionnelles des gènes de plantes (Bevan et al., 1998).

01 Metabolism	02 Energy	03 Cell growth/division	04 Transcription
01.01 Amino acid	02.01 Glycoslysis	03.01 Cell growth	04.01 rRNA synthesis
01.02 Nitrogen and sulphur	02.02 Gluconeogenesis	03.13 Meiosis	04.10 tRNA synthesis
01.03 Nucleotides	02.07 Pentose phosphate	03.16 DNA synthesis/replication	04.19 mRNA synthesis
01.04 Phosphate	2.10 TCA pathway	03.19 Recombination/repair	04.19.01 General TFs
01.05 Sugars and polysaccharides	2.13 Respiration	0.322 Cell cycle	0.419.04 Specific TFs
01.06 Lipid and sterol	2.16 Fermentation	03.25 Cytokinesis	04.19.07 Chromatin modification
01.07 Cofactors	2.20 E-transport	03.26 Growth regulators	04.22 mRNA processing
	2.30 Photosynthesis	03.99 Other	04.31 RNA transport
05 Protein synthesis	**06 Protein destination and storage**	**07 Transporters**	**08 Intracellular traffic**
05.01 Ribosomal proteins	06.01 Folding and stability	07.01 Ions	08.01 Nuclear
05.04 Translation factors	06.04 Targetting	07.07 Sugars	08.02 Chloroplast
05.07 Translation control	06.07 Modification	07.10 Amino acids	08.04 Mitochondrial
05.10 tRNA synthases	06.10 Complex assembly	07.13 Lipids	08.07 Vesicular
05.99 Others	06.13 Proteolysis	07.16 Purine/pyrimidines	08.10 Peroxisomal
	06.20 Storage proteins	07.22 Transport ATPases	08.13 Vacuolar
		07.25 ABC-type	08.16 Extracellular
		07.99 Others	08.19 Import
			08.99 Others
09 Cell structure	**10 Signal transduction**	**11 Disease/defence**	**20 Secondary metabolism**
09.01 Cell wall	10.01 Receptors	11.01 Resistance genes	20.01 Phenylpropanoids/ phenolics
09.04 Cytoskeleton	10.04 Mediators	11.02 Defence-reglated	20.02 Terpenoids
09.07 ER/Golgi	10.04.04 Kinases	11.03 Cell death	20.03 Alkaloids
09.10 Nucleus	10.04.07 Phosphatases	11.04 Cell rescue acids	20.04 Non-protein amino
09.13 Chromosomes	10.04.10 G proteins	11.05 Stress responses	20.05 Amines
09.16 Mitochondria	10.99 Others	11.06 Detoxification	20.06 Glucosinolates
09.19 Peroxisome		11.99 Others	20.99 Others
09.25 Vacuole			
09.26 Chloroplast			
09.99 Others			
	12 Unclear classification	**13 Unclassified**	**Transposons**
			14.01 LTR retroelements
			14.02 Non-LTR retroelements
			14.99 Other

➢ ***Albumines***

L'ensemble des protéines identifiées ainsi que leur classification fonctionnelle sont présentées en Annexe 2, sous forme d'un tableau général (Tableau S2) et de plusieurs cartes protéomiques montrant les gels 2D et les numéros de spots listés dans le tableau S2 (Figure S2). Sur ces bases, les 608 protéines (albumines) qui constituent le protéome de la graine mature sèche de *P. douarrei* se répartissent comme suit (Figure 60).

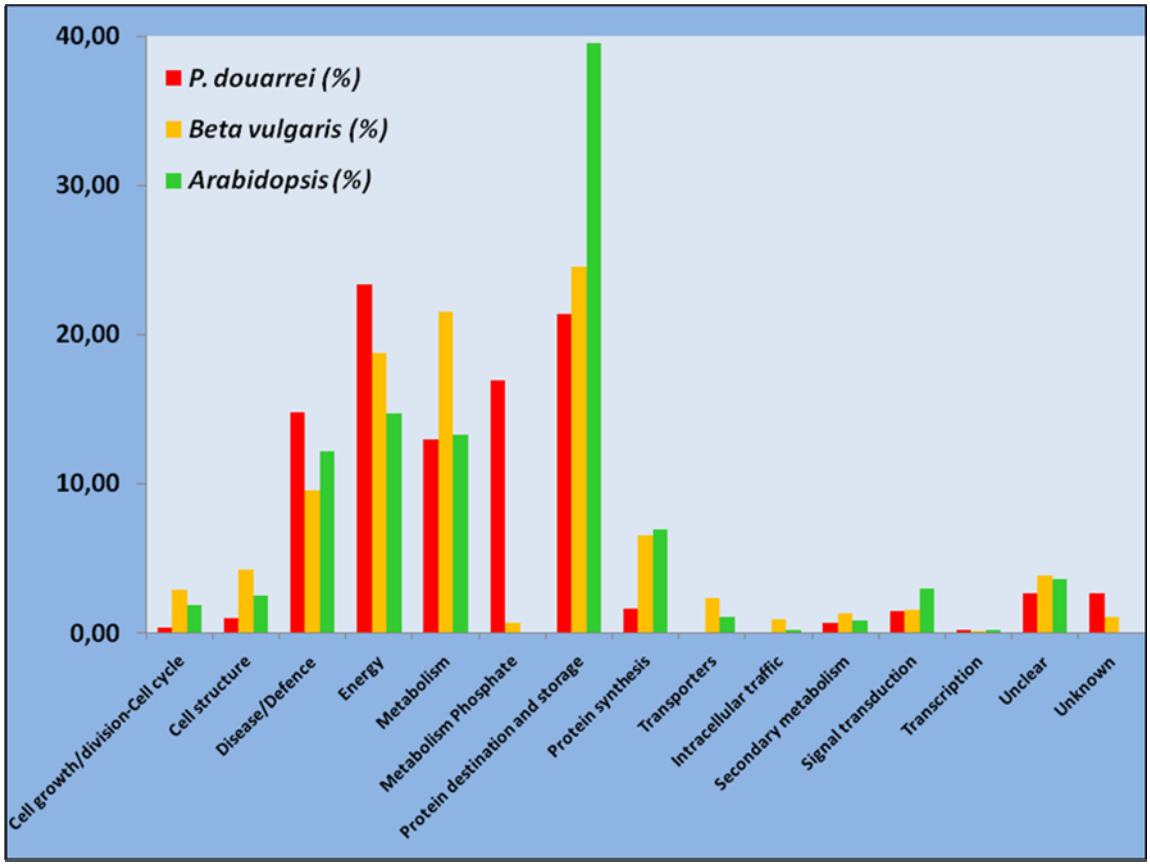


Figure 60 : Classes ontologiques selon Bevan et al. (1998) du protéome de la graine mature sèche de *Psychotria douarrei*. Les données sont comparées avec celles obtenues pour le protéome des graines matures sèches de *Beta vulgaris* (Catusse et al., 2008) et d'*Arabidopsis thaliana* (Rajjou et al., 2008).

En premier lieu, on peut noter que, globalement, le protéome de la graine mature sèche de *P. douarrei* ressemble nettement aux protéomes de la graine de *B. vulgaris* (Catusse et al., 2008) et d'*A. thaliana* (Rajjou et al., 2008). En effet, les principales composantes fonctionnelles du protéome d'une graine, décrites dans ces travaux de référence, se retrouvent bien dans le protéome de *P. douarrei*. Il s'agit notamment des catégories « Disease/Defence », « Energy », « Metabolism », « Protein destination and storage » qui sont les classes

majoritaires chez les graines des trois espèces (Figure 60). Toutefois, certaines fonctions sont différentiellement représentées au sein des graines de *P. douarrei* en comparaison de *B. vulgaris* et *A. thaliana* (Figure 60). C'est le cas par exemple des protéines intervenant dans les mécanismes de défense et les mécanismes énergétiques (Figure 60). A l'inverse, certaines protéines impliquées dans les fonctions de croissance cellulaire, de structure cellulaire ainsi que de la synthèse protéique sont sous représentées en comparaison de *B. vulgaris* et *A. thaliana* (Figure 60). Malgré cette similitude globale, un fait marquant concerne les protéines du métabolisme du phosphate qui sont exceptionnellement représentées chez les graines de *P. douarrei* en comparaison de celles de *B. vulgaris* et d'*A. thaliana* (Figure 60). Elles sont d'ailleurs présentes en quantité et en nombre si importants au sein de la graine de *P. douarrei* (Figure 61) que nous avons dû les séparer de la classe fonctionnelle du métabolisme afin de mieux appréhender l'impact de cette catégorie du métabolisme du phosphate.

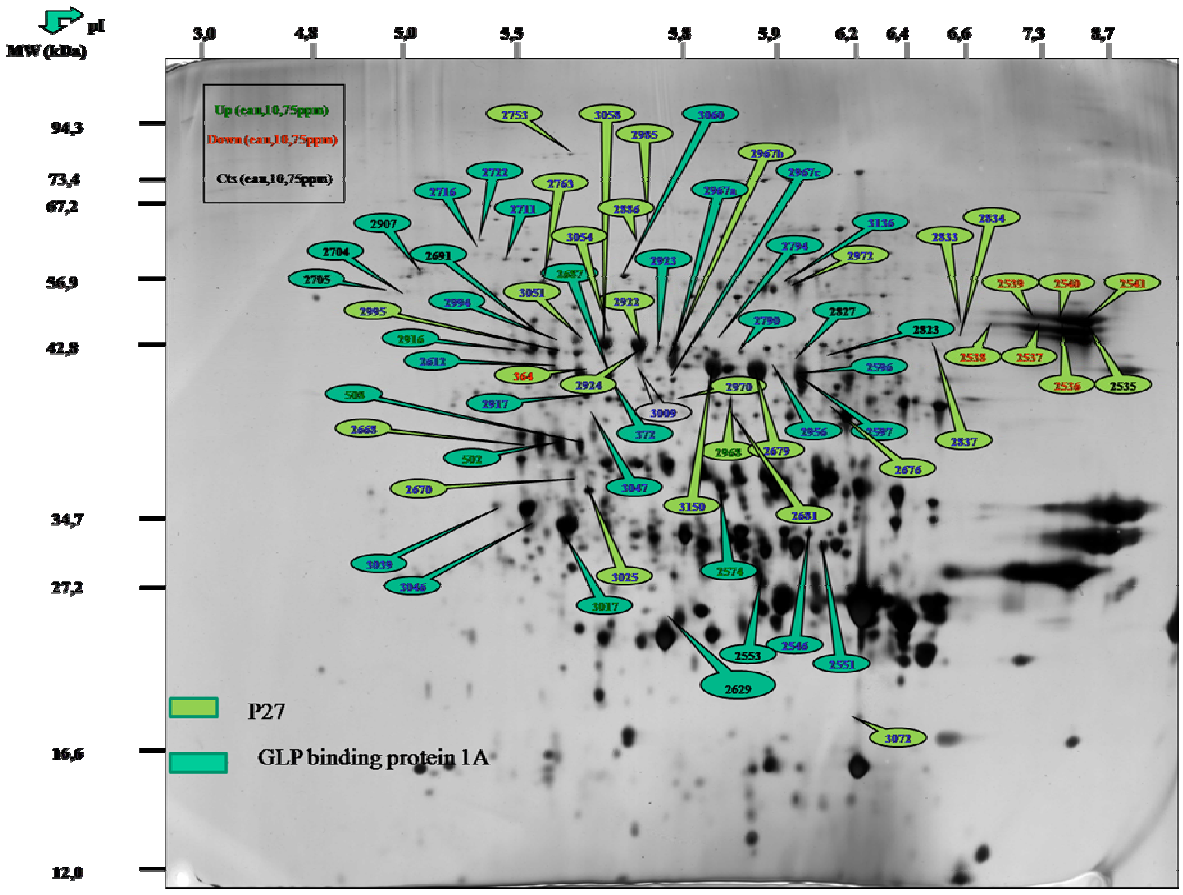


Figure 61 : *Gel 2D montrant les protéines albumines de P. douarrei identifiées comme appartenant à la classe fonctionnelle des protéines du métabolisme du phosphate. Le protéome contient deux protéines de cette classe : la protéine p27SJ de millepertuis (représentée en bleu) et la protéine GLP-binding protein 1a d'A. thaliana (représentée en vert). Cf le tableau S1 en Annexe*

En effet, sur les 608 protéines constituant le protéome de la graine de *P. douarrei*, 103 (17%) d'entre elles interviennent dans le métabolisme du phosphate, ce qui représente 57% des protéines du métabolisme (Figure 61). Fait plus remarquable encore, l'analyse par BLAST de cette classe fonctionnelle révèle que les 103 protéines identifiées appartiennent à une seule et même famille, les protéines nommées DING. Dans notre protéome, on retrouve ces protéines sous deux noms : la protéine «Germin-like-proteins binding» protein 1a *d'A. thaliana* et la protéine p27^{SJ} de millepertuis (Tableau S2 ; Figure 61).

Les protéines DING constituent un ensemble de protéines bien conservé et largement distribué (Berna et al., 2002 ; Berna et al., 2009), et dont la masse moléculaire est de l'ordre de 40 kDa. On les retrouve chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux (Berna et al., 2002). Elles se caractérisent principalement par une séquence N-terminale de type DINGGG- d'où l'origine de leur nom (Berna et al., 2002 ; Pantazaki et al., 2007 ; Figure 62).

```
  1 madinggga t lpqalyqtsg vltagfapyi gvgsgngkaa flnndytkfq agvtnknvhw
 61 agsdsklsat elstyasakq ptwgkliqvp svgtavaipf nksgtaavdl svselcgvfs
121 gritdwsgis gsgrtgaitv vyrsessgtt elftrflnak caetgtfnis ttfgtsytgg
181 lpagavsaag sqgvmtalag adggitymsp dfaaptlagl ddatkvarvg kdvatntagv
241 spaaanvsaa inavpvpast ekpefgkant agvqpyptsg ypilgftnli fsqcyadatq
301 tsqvrdffak hygasnnnda aitanafvpl ptawkatvra sfltasnals igntnvcngi
361 grpl
```

Figure 62 : Séquence de la protéine DING P27^{SJ} de millepertuis. La séquence DINGG N-terminale de la protéine est surlignée en jaune. A noter que la masse moléculaire de cette protéine avait été estimée à 27 kDa (Darbinian-Sarkissian et al., 2006)). Une réévaluation de la séquence codante d'un ADNc de plus grande longueur montre que cette protéine est de l'ordre de 40 kDa, comme la plupart des protéines DING.

Les premières protéines DING de plantes ont été tout d'abord identifiées chez le haricot (Berna et al., 2009). Les protéines DING de plantes ont également été identifiées fortuitement chez *A. thaliana* lors d'une étude concernant des protéines nommées germines qui constituent une large famille chez cette espèce ; une protéine DING pouvant se lier à des germines a ainsi été identifiée et nommée «Germin-like-protein binding protein 1a» (Membré et al., 2000). Plusieurs autres protéines DING ont été identifiées chez la tomate, le tabac, la pomme de terre, la patate douce, le blé et chez *A. thaliana*, ce qui semble indiquer que ces dernières sont ubiquistes chez les angiospermes (Berna et al., 2002). Toutefois, de manière troublante, les gènes codant les protéines DING n'ont pu être identifiés à ce jour chez les plantes (Morales et al., 2007 ; Diemer et al., 2007 ; Berna et al., 2009). Leur existence chez les eucaryotes reste mystérieuse, voire contestée. Ainsi, une publication récente

questionne une telle existence chez les eucaryotes, attribuant les résultats de la littérature à des contaminations par des bactéries des tissus animaux ou végétaux analysés (Lewis et Crowther, 2005). Au plan moléculaire, les gènes codant les protéines DING ont jusqu'à présent été formellement identifiés uniquement chez les bactéries (Pantazaki et al., 2007 ; Berna et al., 2002 ; Berna et al., 2009), ce que nous avons confirmé par des analyses en Blast.

Les protéines DING sont des protéines stables impliquées dans différents processus. Une des plus caractéristiques est la concentration et la séquestration du phosphate environnant par la protéine elle-même chez *Pseudomonas fluorescens* avant sa prise en charge par des transporteurs de la membrane cytoplasmique (Scott et Wu, 2005). Les protéines DING bactériennes peuvent aussi jouer un rôle dans l'activation de la biosynthèse de la phosphatase alcaline. Cette activation est régulée par la concentration environnante en phosphate et le contrôle de la transduction du signal requiert l'intervention d'un système de transporteur spécifique des phosphates appartenant à la famille des transporteurs de type ABC (Pantazaki et al., 2007). Cependant, concernant les protéines DING des plantes et notamment les GLP-binding proteins, on peut noter une faculté à se lier à des enzymes (e.g., oxalate oxydase, superoxyde dismutase…) (Berna et al., 2002 ; Berna et al., 2009). Des homologies ont aussi été notées entre une protéine DING identifiée chez les tubercules d'artichauts de Jérusalem et des phosphatases alcalines de la super famille des «phosphates binding proteins» de *Pseudomonas* (Griffaut et al., 2007). La caractérisation de protéines DING de tissus animaux et végétaux a mis en évidence une capacité des protéines DING à servir de ligands pour d'autres protéines. Ainsi Berna et al. (2009) notent que les protéines DING peuvent agir comme des co-transporteurs ou chaperones à d'autres protéines. Il a été aussi noté que la génistéine et la cotinine intervenaient suivant le même principe (Berna et al., 2009) mais l'élément le plus marquant concernant notre système est la molécule CAI (crystal adhesion inhibitor). En effet, il a été reporté que les protéines DING ont un rôle à jouer dans la biominéralisation. Berna et al. (2002) notent que les protéines DING peuvent générer et immobiliser une quantité importante de phosphates libres qui seraient à l'origine de la calcification dans les systèmes animaux. Ce mécanisme serait contrôlé par une enzyme clé, la nucléoside triphosphate pyrophosphatase. La formation des cristaux d'oxalate de calcium dans des compartiments vacuolaires spécialisés serait la conséquence de ce phénomène mais aucun lien direct n'a encore été mis en évidence.

Membré et al. (2000) reportent dans une étude menée sur *Arabidopsis* une faculté des protéines DING et notamment des GLPs à lier un métal. En effet, la présence d'histidines dans ces protéines pourrait permettre de chélater des métaux.

La caractérisation d'une autre protéine DING chez les plantes provient d'une étude réalisée récemment chez le millepertuis (Darkinian-Sarkissian et al., 2006). De manière intéressante, cette protéine, dénommée $p27^{SJ}$, est retrouvée en abondance dans notre protéome des graines de *P. douarrei* (Tableau S2 ; Figure 61). En effet, les homologues de $P27^{SJ}$ apparaissent 40 fois dans le protéome des albumines de *P. douarrei* sur les 103 protéines du métabolisme du phosphate (Figure 61). Fait étonnant, cette protéine de millepertuis s'avère capable d'entraver l'expression de génome du virus HIV-1. Dans ce mécanisme, la protéine $p27^{SJ}$ interagit avec l'activateur transcriptionnel C/EBPß et le trans-activateur Tat en empêchant leur localisation nucléaire (Darkinian-Sarkissian et al., 2006).

En tenant compte de la bonne conservation des séquences des protéines DING et de leurs propriétés ubiquistes, certains caractères exprimés jusqu'à présent essentiellement chez des bactéries ou des animaux nous paraissent dignes d'intérêt en relation avec la tolérance de *P. douarrei* au nickel. Ainsi, il a été noté chez *Pseudomonas fluorescens* l'existence de protéines DING étroitement liées au composant périplasmique binding Pi des transporteurs de type ABC (Zhang et al., 2007). Il a aussi été noté une étroite corrélation entre les protéines DING et les protéines de type CAI (calcium aggregation inhibitor) des cellules rénales de singes localisées dans le cytosol et les membranes plasmiques (Perera et al., 2008).
Ainsi, dans notre cas, nous faisons l'hypothèse que la présence en quantité importante de protéines de type DING (GLP-binding protein 1a et $p27^{SJ}$) dans la graine de *P. douarrei* soit, au moins en partie, à l'origine des mécanismes de tolérance au nickel des graines de cette espèce. Bien qu'aucune étude fonctionnelle impliquant les protéines DING de plantes n'ait été menée à ce jour, nous proposons, à l'appui de nos résultats obtenus dans l'étude sur l'ultrastructure et la répartition minérale des graines de *P. douarrei*, et de par les différentes caractéristiques fonctionnelles décrites plus haut des protéines DING, un mécanisme pour expliquer la tolérance au nickel. Ce mécanisme est représenté dans la Figure 63.
Généralement, les mécanismes de tolérance ont pour finalité de maintenir l'intégrité d'un individu ou de sa progéniture dans des conditions de stress. La graine de *P. douarrei* nous procure un bon exemple d'un tel mécanisme de protection de l'embryon. En effet, l'occurrence d'un gradient de nickel de la partie externe de l'albumen vers l'embryon suggère un rôle protecteur de l'albumen envers l'embryon. Cette caractéristique conduit d'une part à soupçonner un mécanisme de transport symplastique des éléments et en particulier du nickel. D'autre part, nos données protéomiques s'accordent avec ces observations en supposant que les protéines de type DING peuvent être associées ou étroitement liées à une fonction

transporteur de type ABC. De par le gradient de nickel observé en microscopie électronique à balayage, ces transporteurs ABC pourraient jouer un rôle en filtrant l'élément nickel à travers les couches cellulaires de l'albumen. Les transporteurs ABC étant des transporteurs de type actif, ils sont consommateurs d'énergie et utilisent de l'ATP. Nos observations en microscopie électronique à balayage confirmeraient cette hypothèse de par l'importance de l'élément phosphore au niveau de la couche externe de l'albumen (Figure 63).

Les protéines DING pourraient également jouer un rôle dans la formation des cristaux d'oxalate de calcium localisés dans la partie interne de l'albumen et/ou dans leur dégradation (activité oxalate oxydase associée aux germines). Elles interviendraient alors durant la phase germinative afin de désorganiser les cristaux d'oxalate de calcium, libérant ainsi le calcium nécessaire à l'accomplissement de la germination (Figure 63).

Une zonation bien marquée de l'albumen comprenant ainsi une partie riche en nickel et phosphate et une partie riche en calcium et oxalate ainsi que l'occurrence d'une même famille de protéines intervenant dans des mécanismes utilisant ces éléments suggèrent l'existence de liens étroits.

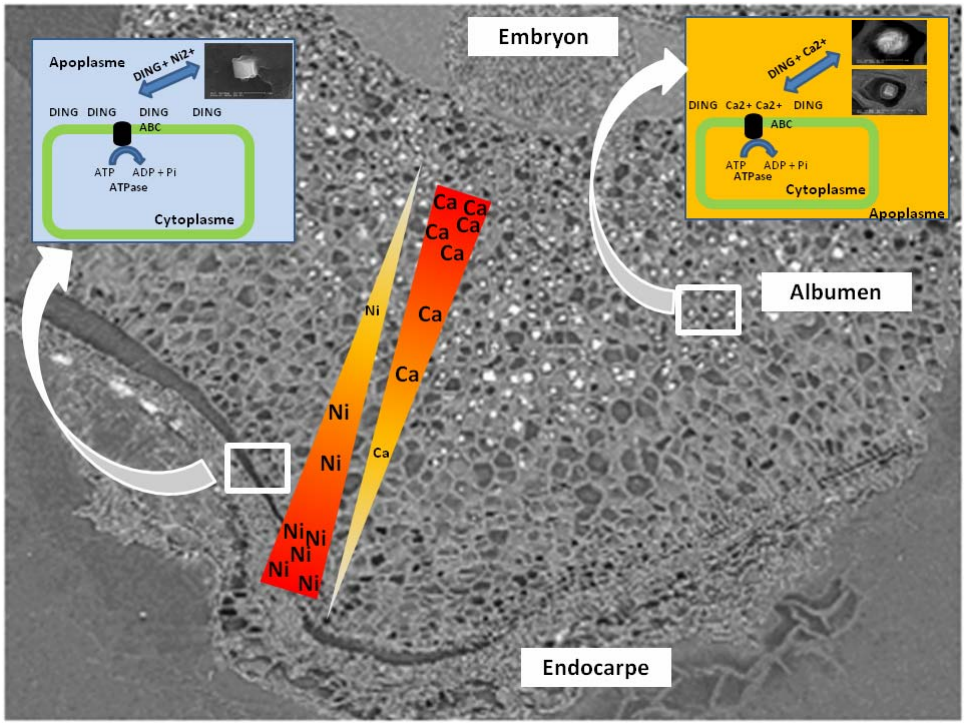


Figure 63 : Hypothèses concernant l'implication des protéines DING dans les mécanismes de tolérances de la graine de *P. douarrei*

Comme nous l'avons souligné plus haut, peu d'études ont été menées à ce jour sur les protéines de type DING de plantes, et la plupart de ces protéines ont été moléculairement caractérisées à partir de bactéries. En effet, si des séquences d'ARN ont pu être caractérisées à

partir de plantes, aucune séquence génomique n'a encore pour l'instant confirmée l'existence de gènes codant des protéines DING dans le règne végétal.

Plus encore, tous les gènes codant les protéines DING trouvées chez les eucaryotes sont également absents des bases de données nucléotidiques, que ce soit pour le rat, la pomme de terre, *Leishmania major* ou les protéines DING humaines (Diemer et al., 2007). Il faut noter, à l'appui de nos travaux qu'une protéine DING humaine nommée HPBP (Human phosphate binding protein) a été séquencée complètement par radiocristallographie et spectrométrie de masse (Morales et al., 2006 ; Morales et al., 2007). Cette apolipoprotéine est une Solute Binding Protein (SBP) qui fixe le phosphate et qui, chez les procaryotes, sont associées aux transporteurs ABC qui permettent le passage transmembranaire de molécule très diverses (Morales et al., 2007). Ce séquençage a permis d'identifier le site de fixation des phosphates au niveau des HPBPs représenté par huit acides aminés déjà caractérisés dans les SBP des procaryotes (Morales et al., 2006). Ce premier séquençage complet d'une protéine DING a montré une très grande similarité avec les protéines bactériennes à forte affinité pour le phosphate. Cette étude a montré que malgré l'absence systématique de gènes DING eucaryotes dans les bases de données, il existe une conservation importante des séquences entre des espèces très distantes. De plus l'abondance des protéines HPBPs humaines suggère, comme dans notre cas, que des problèmes techniques comme de la contamination par des bactéries ne peuvent simplement expliquer les résultats obtenus (Diemer et al., 2007).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce paradoxe :

1/ les génomes de plantes ne sont pas entièrement séquencés, même chez les plantes modèles, et il est possible que ces gènes soient localisés dans des régions encore inconnues des génomes des plantes ;

2/ les génomes des plantes pourraient renfermer des protéines DING, mais au cours de l'évolution, leur séquence N-terminale caractéristique aurait été éliminée, rendant difficile leur mise en évidence ;

3/ seules les espèces hyperaccumulatrices de nickel auraient acquis de tels gènes pour constituer un mécanisme de tolérance ;

4/ les protéines DING rencontrées chez la graine de *P. douarrei* proviendraient de bactéries portées par les graines.

Comme mentionné plus haut, constatant la très forte représentation (nombre de spots et quantités) de ces protéines DING chez *P. douarrei* (Figure 61), il semble difficile d'être en présence d'une simple contamination car ces protéines sont chez les bactéries des protéines plutôt minoritaires et, par ailleurs, on ne rencontre pas dans notre protéome d'autres protéines

d'origine bactérienne représentées en masse. Une hypothèse séduisante serait que des bactéries particulières aient développé des associations commensales avec *P. douarrei* conférant à cette plante un mécanisme original de tolérance exceptionnelle au nickel grâce au concours de ces protéines DING. Il convient de rappeler que *P. douarrei* accumule des quantités considérables de nickel, sans commune mesure avec ce que l'on trouve dans les modèles de plantes actuellement étudiés (Verbruggen et al., 2009). De fait, seul un mécanisme totalement nouveau permettrait de rendre compte d'une telle propriété exceptionnelle.

Ces différentes hypothèses soulèvent de nombreuses questions nécessitant un travail expérimental supplémentaire. Parmi les différentes stratégies à mettre en œuvre, il conviendrait par exemple :

1/ de fabriquer des anticorps anti-peptides grâce à nos séquences peptidiques, ce qui nous permettrait de suivre l'expression spatiotemporelle des protéines DING (expression dans la graine et les parties végétatives) et, en particulier dans la graine, de suivre l'expression de ces protéines en regard de nos observations sur la compartimentation tissulaire du phosphate, du nickel, du calcium et de l'oxalate ;

2/ de concevoir des amorces ARN/ADN spécifiques pour cloner des ADNc pleine longueur chez *P. douarrei* et/ou bactéries potentiellement commensales ;

3/ d'isoler les bactéries des graines de *P. douarrei* qui dirigeraient la synthèse des protéines DING et de caractériser la nature des interactions entre la plante hôte et ces bactéries ;

4/ enfin, il sera nécessaire d'étendre ces études à d'autres espèces hyperaccumulatrices, notamment rencontrées en Nouvelle-Calédonie, pour étudier la généralité d'un tel mécanisme.

En dehors de ces protéines de type DING, d'autres protéines plus classiques appartenant aux classes du métabolisme du stress et de la détoxication (e.g., peroxydase, lactoyl-glutathion lyase, superoxyde dismutase…) ont été identifiées dans le protéome des graines de *P. douarrei* (Tableau S2). Leur présence dans la graine renforcerait ainsi les mécanismes nécessaires à la tolérance au nickel. Cette présence indiquerait aussi que le nickel induit un stress oxydant dont il conviendra de mettre en évidence les différentes manifestations (par exemple, l'oxydation des protéines ; Oracz et al., 2007).

Dans ce contexte, il convient de noter l'existence de protéines de réponse au stress de dessiccation, notées «desiccation related protein (PCC13-62 like)», retrouvée dans 25 spots de la graine entière de *P. douarrei* (Tableau S2). Ces protéines rappellent les fameuses protéines LEA (late embryogenesis abundant) décrites chez les graines de la plupart des

angiospermes et supposées jouer un rôle central dans la tolérance des graines au stress de dessiccation survenant en fin de maturation des graines orthodoxes (Dure et al., 1989 ; Kermode, 1997 ; Tunnacliffe et Wise, 2007). En général, comme leur nom l'indique, ces protéines s'accumulent de manière stricte au niveau des graines. Or, dans notre cas, les protéines de dessiccation de *P. douarrei* s'apparentent toutes, curieusement, à une protéine de dessiccation mise en évidence dans les parties végétatives de la plante de résurrection, *Craterostigma plantagineum* (Piatkowski et al., 1990), la protéine PCC13-62 like (Tableau S2). Ce phénomène n'est pas observé chez les graines de betterave à sucre chez lesquelles plusieurs classes de protéines LEA canoniques ont été identifiées (Catusse et al., 2008). Cette différence indiquerait donc que chez les graines de *P. douarrei* les protéines de tolérance à la dessiccation, nécessaires à la survie de la graine à l'état sec, dériveraient plus des gènes (et donc des mécanismes) des protéines de stress rencontrées chez les plantes de résurrection (et s'exprimant dans les parties végétatives de ces plantes suite à un stress hydrique) que des gènes (et donc des mécanismes) des protéines LEA canoniques. Ceci constituerait donc une particularité de la tolérance à la dessiccation des graines de *P. douarrei* et ce phénomène devrait être analysé plus en profondeur en relation notamment avec la question de l'orthodoxie chez cette espèce. Enfin, il est intéressant de noter que les protéines LEA sont capables de fixer les cations de manière forte. De plus, elles sont capables de fixer très fortement et spécifiquement les métaux lourds, dont le nickel avec une très forte affinité spécifique (Kd= 1,8 µM ; 5 sites de fixation), ce qui laisse à penser qu'elles pourraient constituer un mécanisme de détoxication supplémentaire par rapport à cet élément métallique (Hara et al., 2005 ; Svensson et al., 2000). Cette hypothèse séduisante devra être testée plus avant au plan biochimique.

- ***Globulines***

L'ensemble des protéines globulines identifiées est présenté en Annexe 3, sous forme d'un tableau général (Tableau S3) et d'une carte protéomique montrant un gel 2D et les numéros de spots listés dans le tableau S3 (Figure S3). Sur ces bases, 42 protéines ont été identifiées. Parmi celles-ci, on trouve 28 protéines apparentées aux globulines 11S, les protéines de réserve majoritaires chez les graines de plantes dicotylédones (Tableau S3 ; Bewley & Black, 1994). De ce point de vue, les graines de *P. douarrei* sont conformes aux graines des autres plantes dicotylédones (Bewley & Black, 1994).

- ***Glutélines***

L'ensemble des protéines glutélines identifiées est présenté en Annexe 4, sous forme d'un tableau général (Tableau S4) et d'une carte protéomique montrant un gel 2D et les numéros de spots listés dans le tableau S4 (Figure S4). Sur les 31 protéines identifiées, 16 correspondent en fait à des globulines 11S. Contrairement aux globulines 11S, il n'existe aucune donnée sur la séquence et la structure des glutélines de dicotylédones. En revanche, chez les céréales (maïs, riz) les glutélines sont les protéines de réserve majoritaires de la graine. Leur séquence et leur organisation structurale sont très proches de celles des globulines 11S de dicotylédones hormis le fait qu'elles ne sont pas solubles dans les solutions salines diluées (Katsube et al., 1999). Chez les dicotylédones, les seuls travaux existant portent sur l'amaranthe et suggèrent également une homologie structurale entre glutélines et globulines 11S. Abugoch et al. (2003) et Molina et al. (2007) ont de plus montré que chez les graines de cette plante, les glutélines étaient reconnues par des anticorps spécifiques des globulines 11S. Des résultats similaires quant à l'identité des glutélines et des globulines 11S a également été observés chez la graine de betterave à sucre (Catusse, 2007).
Bien que l'on puisse s'interroger sur l'existence de glutélines chez la graine de *P. douarrei*, nos résultats de protéomique indiquent l'existence de deux classes de globulines 11S extractibles dans des solvants différents, ce qui suggère qu'elles ont soit des propriétés structurales distinctes soit des localisations sub-cellulaires différentes. Ceci a déjà été observé chez les graines de betterave à sucre (Catusse, 2007) et cet aspect mériterait de faire l'objet de travaux plus approfondis.

- ***Prolamines***

Notre méthode d'extraction a conduit à l'extraction d'une fraction prolamines, dont 14 ont été identifiées (Annexe 5-Tableau S5 et Figure S5). Aucune ne correspond à des prolamines, en accord avec les résultats de la littérature montrant que cette classe de protéines de réserve n'est présente que chez les graines de céréales (Shewry, 1995).

V.4/ Etude protéomique comparative des différents tissus des graines matures sèches de P. douarrei

L'analyse du protéome de la graine entière nous a livré des indications sur l'existence de mécanismes nouveaux probablement impliqués dans la protection de l'embryon face au stress nickel. Pour mieux comprendre ces mécanismes, nous avons disséqué les graines entières pour isoler des fractions pures contenant uniquement l'albumen ou l'embryon. Des électrophorèses SDS-PAGE ont ensuite été réalisées sur les fractions protéiques de l'albumen et de l'embryon isolés (Figure 64). Les quantités utilisées pour la réalisation de la migration sont décrites ci-dessous :

MT = Marqueurs de taille	5 µL
1 = Albumines de la graine entière	10 µg
2 = Albumines de l'albumen	10 µg
3 = Albumines de l'embryon	10 µg
4 = Globulines de la graine entière	5 µg
5 = Globulines de l'albumen	10 µg
6 = Globulines de l'embryon	10 µg

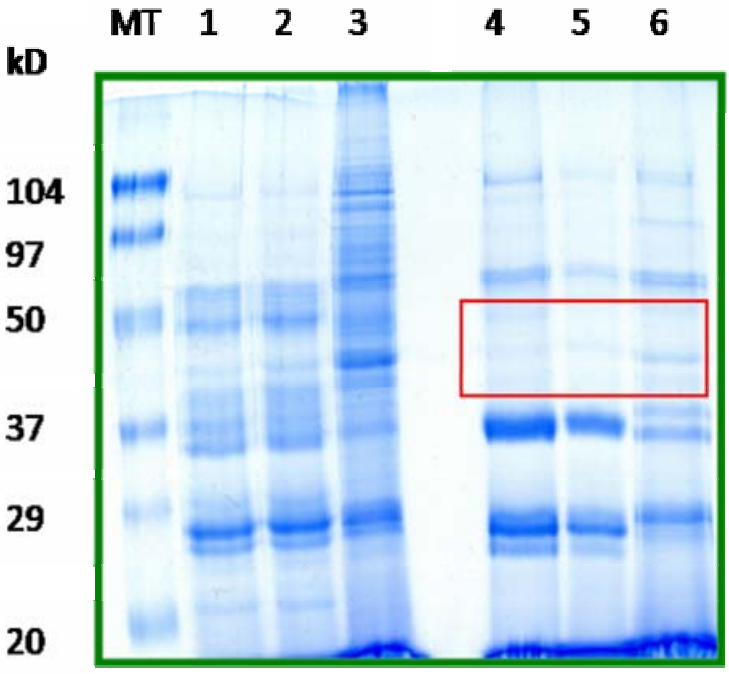


Figure 64 : Electrophorèse SDS-PAGE des fractions albumines et globulines de la graine entière sèche, de l'albumen et de l'embryon de *P. douarrei*

Les résultats de l'électrophorèse corroborent ceux du dosage, à savoir que le profil des bandes des fractions albumines ou globulines de la graine entière se rapproche fortement de ceux de l'albumen. Par contre, si les profils des albumines de la graine entière et de l'albumen

isolé sont très proches, ils sont tous deux très différents de celui de l'embryon isolé. Ces résultats s'expliquent sans doute de par la proportion importante de l'albumen dans la graine de *P. douarrei* et la petitesse de son embryon. De fait, la fraction protéique (albuminique) de l'embryon est totalement masquée par celle de l'albumen.

Quant aux globulines, les profils des trois tissus (graine entière, albumen isolé et embryon isolé) sont très similaires (Figure 64, pistes 4, 5 et 6). Cependant, on peut noter une bande de l'ordre de 37 kDa qui paraît spécifique de l'embryon.

Suite à cette première analyse en gel 1D, nous avons conduit une analyse protéomique des différentes fractions en gel 2D, suivie d'une analyse des protéines en spectrométrie de masse. Les gels 2D de la Figure 65 montrent bien que le profil des protéines albumines de l'embryon isolé est radicalement différent de celui de l'albumen.

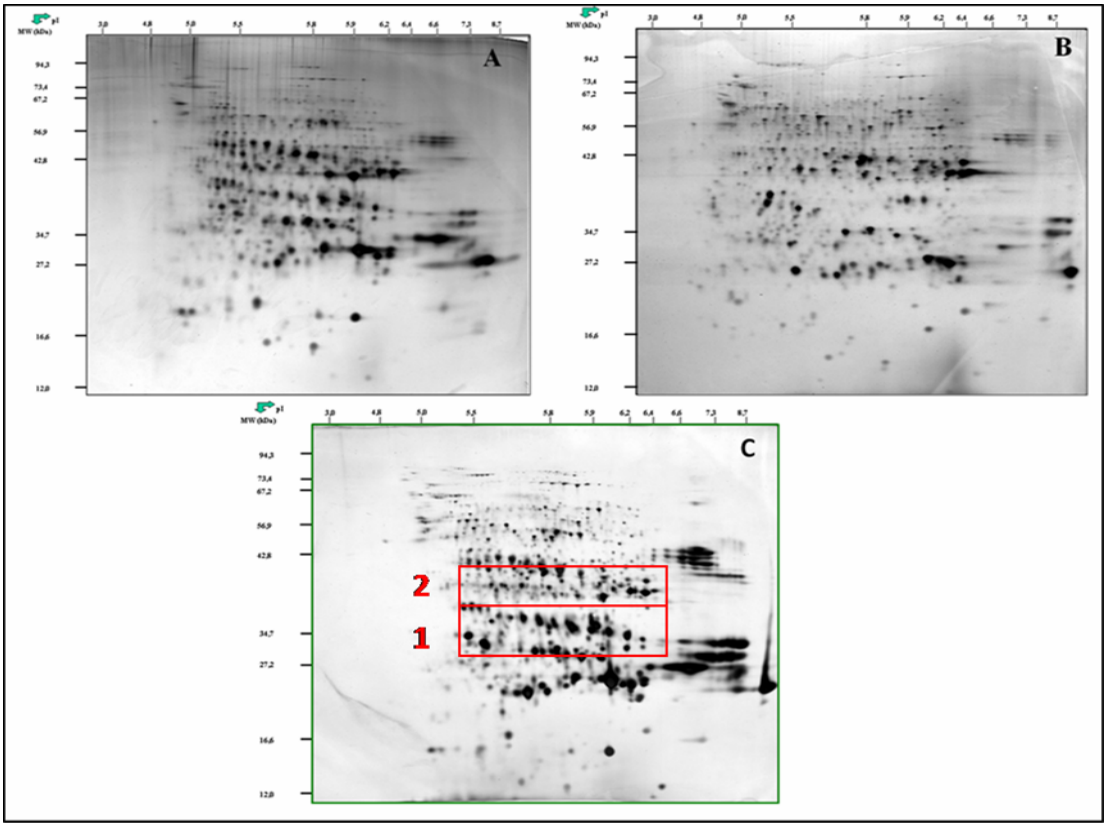


Figure 65 : Comparaison tissulaire des différents profils de fraction albumine de la graine de *P. douarrei*. A : Albumine de la partie albumen, B : Albumine de la partie embryon, C : Albumine de la partie graine mature sèche

Les résultats concernant la caractérisation des protéines albumines de l'embryon isolé sont présentés en Annexe 6, sous forme d'un tableau général (Tableau S6) et d'une carte protéomique montrant un gel 2D et les numéros de spots listés dans le tableau S6 (Figure S6).

Nous avons ainsi identifié 106 protéines albumines, dont la répartition en classes fonctionnelles est présentée dans la Figure 66.

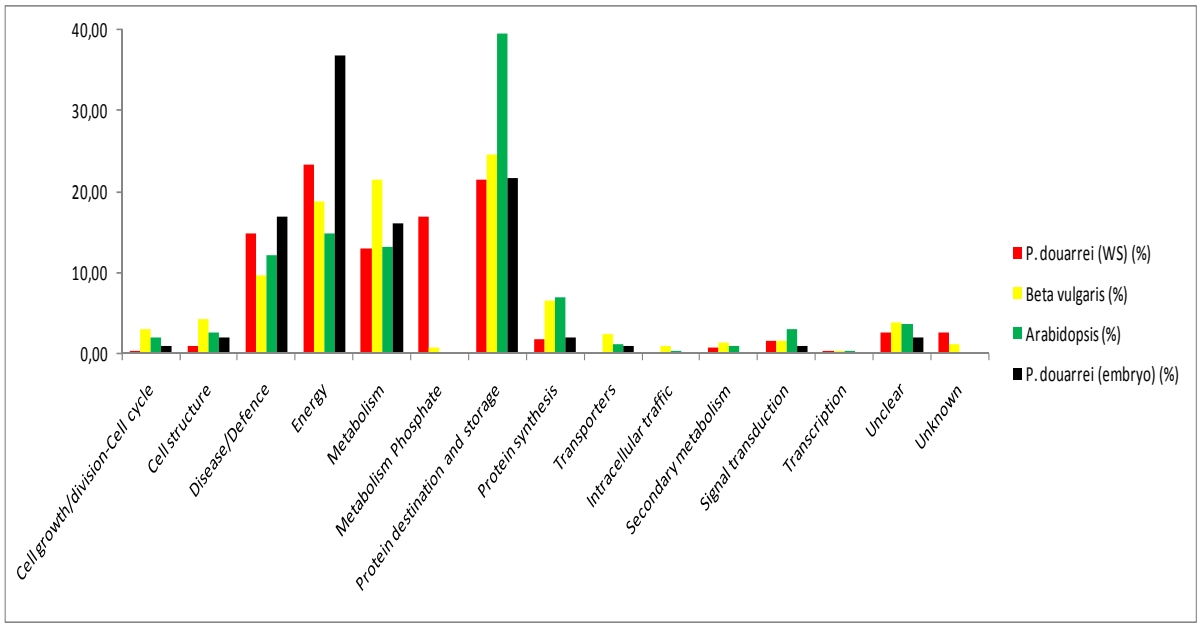


Figure 66 : Classes ontologiques selon Bevan et al. (1998) du protéome de la fraction albumine de l'embryon de *P. douarrei* isolé (barres noires). Les données sont comparées avec celles obtenues pour le protéome de la fraction albumines des graines matures entières de *P. douarrei* (barres rouges ; cf. fig. 23), des graines matures sèches de *B. vulgaris* (barres jaunes ; Catusse et al., 2008) et d'*A. thaliana* barres vertes ; (Rajjou et al., 2008)

Les principales caractéristiques du protéome de l'embryon sont un nombre élevé de protéines dans la classe «Energy» et une totale absence des protéines du métabolisme de phosphate (GLP-binding protein 1a et $p27^{SJ}$). Cette abondance accrue des enzymes de la production d'énergie dans l'embryon suggère l'existence d'un tissu métaboliquement très actif, prêt à enclencher les différents processus de la germination et de la croissance radiculaire. Par ailleurs, l'absence totale des protéines du métabolisme de phosphate (GLP-binding protein 1a et $p27^{SJ}$) dans l'embryon renforce l'idée selon laquelle l'albumen procure à l'embryon une protection efficace envers le stress nickel. Ces résultats suggèrent ainsi que ce mécanisme particulier de tolérance joue probablement un rôle prépondérant lors de la maturation de la graine pour assurer l'intégrité de l'embryon nécessaire à l'émergence d'une plantule vigoureuse à l'issue de la germination. Comme nous l'avons évoqué plus haut, il conviendra d'évaluer l'expression de ces protéines DING au cours du développement de la plantule et de la plante afin de préciser s'il s'agit d'un mécanisme de tolérance ubiquiste chez *P. douarrei* ou bien si d'autres mécanismes spécifiques sont mis en jeu.

V.5/ Etude protéomique de la graine germée de P. douarrei en présence de différentes concentrations de nickel.

Les résultats de la Figure 57 montrent que le nickel affecte la germination des graines de *P. douarrei*. Pour mieux comprendre les mécanismes de l'impact du métal nous avons réalisé des extraits protéiques (albumines et globulines) à partir de graines de *P. douarrei* mises à germer en absence ou en présence de nickel (10 et 75 ppm). Les graines ont été récoltées au même stade d'avancement de la germination, c'est-à-dire au temps T_1, temps d'imbibition correspondant à l'atteinte de 1% de germination dans chaque expérience. Ce temps T_1 représente donc une valeur limite supérieure du temps nécessaire au déroulement de la germination *stricto sensu*.

Dans un premier temps nous avons réalisé une analyse en SDS-PAGE 1D. Les résultats de cette analyse sont présentés en Figure 67. Ils montrent que le profil de la fraction des protéines albumines évolue de manière notable au cours de la germination *stricto sensu* (Figure 67), en absence ou présence de nickel. En revanche, le profil des protéines globulines est sensiblement le même dans toutes les conditions, en accord avec le fait que les globulines sont massivement mobilisées lors de la phase d'installation de la plantule, évènement tardif par rapport à la germination *stricto sensu* que nous avons ciblé dans ces expériences.

MT = Marqueurs de taille
1 = Albumines de la graine sèche
2 = Albumines de la graine germée (eau)
3 = Albumines de la graine germée (10 ppm)
4 = Albumines de la graine germée (75 ppm)
5 = Globulines de la graine sèche
6 = Globulines de la graine germée (eau)
7 = Globulines de la graine germée (10 ppm)
8 = Globulines de la graine germée (75 ppm

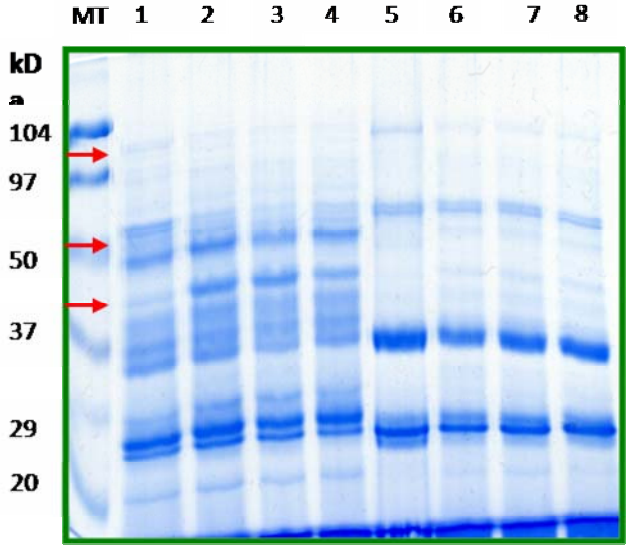


Figure 67 : Electrophorèse SDS-PAGE des fractions albumines et globulines de la graine entière sèche de *P. douarrei*, de la graine entière germée dans l'eau, dans 10 ppm d'acétate de Ni ou dans 75 ppm d'acétate de Ni

Les gels 2-DE des fractions albumines du protéome de la graine sèche et de la graine germée dans l'eau, 10 ppm et 75 ppm sont reportés sur la Figure 68. Trois gels reproductibles ont été obtenus pour chaque échantillon, ce qui a permis d'entreprendre une analyse quantitative et statistique du volume des spots et donc comparer l'évolution du protéome lors des divers traitements.

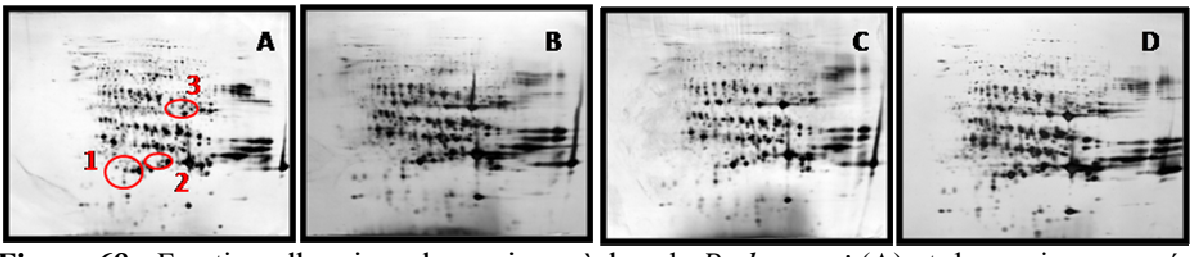


Figure 68 : Fraction albumines des graines sèches de *P. douarrei* (A) et des graines germées sur eau (B), 10 ppm ou 75 ppm (d) de Ni acétate. Les cercles rouges représentent des zones où les variations de volume des spots des différents échantillons sont perceptibles

Les résultats de cette analyse densitométrique sont consignés dans le tableau S1. Trois classes de protéines ont été annotées. Une classe de protéines dont le niveau d'accumulation ne varie pas significativement dans les expériences de germination et deux classes de protéines dont les niveaux varient, soit positivement (UP) soit négativement (DOWN). Quelques exemples de telles variations sont présentés en Figure 69.

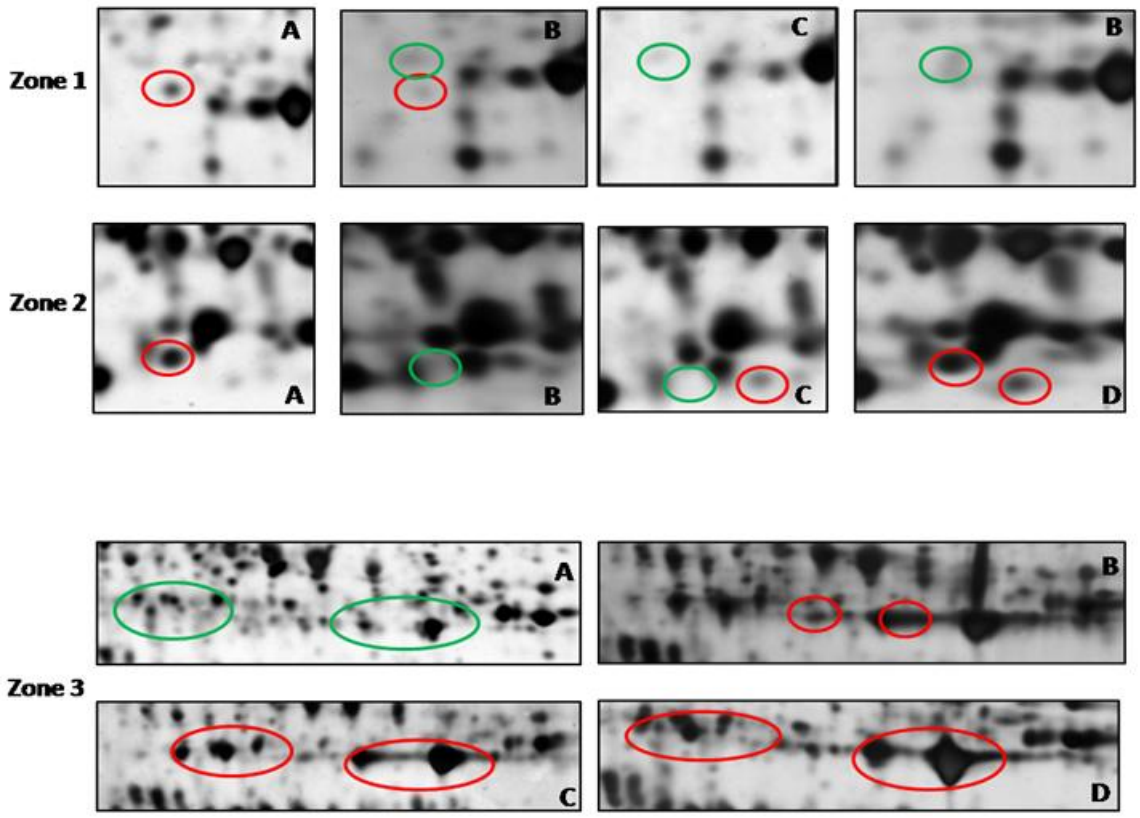


Figure 69 : Grossissements de la zone 1, 2, 3 des gels 2-DE des albumines de la graine sèche (A), germée dans de l'eau (B), de la graine germée dans 10 ppm d'acétate de Ni (C) et dans 75 ppm d'acétate de Ni (D). Le cercle rouge indique un spot présent, et le cercle vert indique un spot absent.

Par exemple, dans les expériences de germination sur eau, nous trouvons 20 protéines DOWN et 41 protéines UP. Ces dernières, qui jouent probablement un rôle éminent dans la germination, se répartissent dans les catégories fonctionnelles présentées dans la Figure 70.

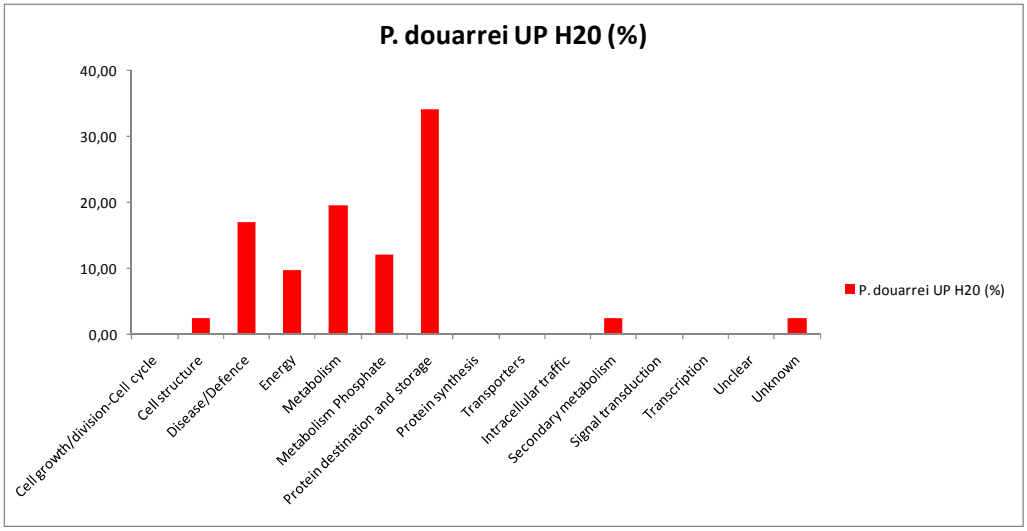


Figure 70 : Classes ontologiques des protéines albumines UP régulées lors de la germination *stricto sensu* dans de l'eau des graines *de P. douarrei*

L'analyse du tableau S2 montre que parmi les huit protéines UP régulées de la classe «Metabolism», nous trouvons cinq alpha-galactosidases, en accord avec le rôle de ces enzymes dans la métabolisation, lors de la germination, de sucres de type raffinose et stachyose que l'on trouve en abondance chez les graines (Carmi et al., 2003). Par ailleurs, parmi les 14 protéines UP régulées de la classe «Protein destination and storage», nous trouvons 11 fragments de globulines 11S solubilisés dans la fraction albumines indiquant l'initiation de la mobilisation des protéines de réserve lors de la germination *stricto sensu* (Job et al., 1997). Enfin, nous trouvons que cinq protéines $p27^{SJ}$ de la classe du métabolisme de phosphate sont UP régulées lors de la germination *stricto sensu*, suggérant que ces protéines auraient également un rôle dans les phases précoces de la germination.

Nous avons examiné de manière globale l'effet du nickel sur le protéome (albumines) des graines de *P. douarrei* lors de la germination *stricto sensu* (Figure 71). Il s'avère que le nickel entraîne une diminution nette du nombre de protéines UP régulées en comparaison avec la condition temoin en absence de nickel, tout en ne modifiant pas sensiblement le nombre de protéines DOWN régulées. Il est raisonnable de proposer que ces protéines UP régulées jouent un rôle prépondérant lors de la germination *stricto sensu*. De fait, l'introduction de nickel dans la solution d'imbibition des graines se traduit par un empêchement de l'accumulation de ces protéines, ce qui pourrait indiquer l'existence d'un stress imposé par le métal.

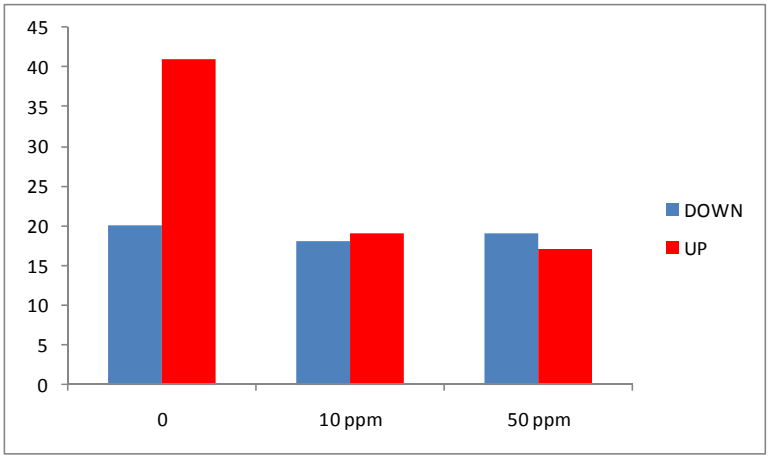


Figure 71 : Nombre de protéines albumines UP (rouge) et DOWN (bleu) régulées lors de la germination *stricto sensu* des graines de *P. douarrei.*

VI/ Conclusion

Au terme de cette étude, plusieurs points nouveaux concernant les mécanismes adaptatifs développés par des graines d'espèces hyperaccumulatrices de nickel ont été mis en évidence. Cependant, la complexité de la problématique due essentiellement à l'originalité et à la spécificité de ce dernier, ainsi que la pauvreté des études traitant cet aspect de l'hyperaccumulation et des mécanismes de tolérance, conduisent à de plus amples questionnements dans l'objectif d'appréhender encore mieux ces phénomènes. Dans tous les cas, les avancées à l'issue de ce travail sont importantes et des plus intéressantes.

En effet, la caractérisation des traits éco-physiologiques les plus importants a pu être menée à terme. Ainsi, les résultats du suivi phénologique et de l'étude concernant les caractéristiques éco-physiologiques à savoir, la détermination de la structure des semences de *Psychotria douarrei* et *P. baillonii* ainsi que la détermination des conditions optimums de germination ont permis l'acquisition de données essentielles et utiles pour la mise en place d'études ultérieures (dynamique des populations, stratégie reproductive, étude génomique…).

Dans le cadre de notre étude, les résultats escomptés vont au-delà de nos espérances. En effet, l'étude ultrastructurale de la répartition minérale au sein des graines de *P. douarrei* et de *P. baillonii* a permis de définir une zonation originale de l'élément nickel, traduisant sans ambigüité une stratégie de protection efficace de l'embryon mise en place par les tissus de la graine. La forte pression édaphique subie par les graines de ces plantes (importantes quantités de nickel) a conduit à la mise en place de mécanismes originaux et notamment, la formation de cristaux de sel de nickel au sein de la graine de *P. douarrei*.

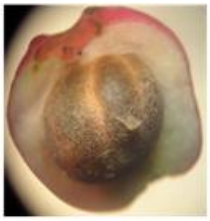
L'étude protéomique menée par la suite a permis de proposer des mécanismes nouveaux expliquant les résultats de l'étude ultrastructurale. La réalisation de la première carte protéomique de graine d'une espèce hyperaccumulatrice de nickel est déjà en elle-même, une avancée considérable. Ce travail a en effet permis de mettre en évidence que si le protéome des graines de *P. douarrei* montre des ressemblances avec le protéome de graines d'autre plantes (betterave à sucre, *Arabidopsis*), des différences majeures existent. Nous avons ainsi noté une représentation particulière en protéines LEA, protéines caractéristiques de la phase de dessiccation sur la plante-mère. Par ailleurs, nous avons identifié deux types de protéines du métabolisme du phosphate, $P27^{SJ}$ et la GLP-Binding protein 1a, qui sont toutes

deux des protéines de la famille DING, dans les graines de *P. douarrei*. Cette découverte nous permet de dévoiler une stratégie originale de tolérance au nickel au sein des graines de *P. douarrei*. Cette stratégie basée d'une part sur le rôle joué par des transporteurs ABC comme filtre du nickel et d'autre part par des protéines Germin-like régulant la germination est tout à fait originale, s'en résultant du fait que les études sur la tolérance des plantes aux métaux lourds concernent uniquement des plantes qui sont des centaines de fois moins tolérantes au nickel que nos graines de *P. douarrei*. De fait, il n'est pas étonnant de constater que, face aux conditions environnementales extrêmes régnant au niveau des sols ultramafiques de la Nouvelle-Calédonie, les plantes endémiques aient mis au point des stratégies de survie uniques. Ces avancées illustrent ainsi d'un jour nouveau la compréhension des mécanismes de tolérance. Cependant, plusieurs aspects doivent être approfondis.

Ainsi, concernant les cristaux de sel de nickel, des analyses devraient encore être menées afin d'identifier la(les) molécule(s) chélatant le nickel.

Pour ce qui est de la partie protéomique, de nombreuses pistes sont à considérer. Parmi ces pistes, la recherche d'une bactérie commensale présente au sein de la graine est prioritaire afin de s'assurer de l'origine séminale des protéines mises en évidence dans le protéome. Ensuite, la fabrication d'anticorps anti-peptides spécifiques de nos protéines DING serait un progrès considérable afin de suivre la compartimentation de ces protéines au sein des différents tissus de la graine. Il apparaît aussi intéressant de mener les mêmes analyses sur les graines d'autres espèces hyperaccumulatrices de la Nouvelle-Calédonie afin d'appréhender la généralité d'un tel mécanisme. Par ailleurs, une étude plus spécifique concernant l'activité des protéines $P27^{SJ}$ devrait être initiée afin d'apprécier son caractère thérapeutique qui pourrait s'avérer d'importance en regard des travaux sur les propriétés anti-virales de la protéine $p27^{SJ}$ (Darbinian et al., 2008 ; Mukerjee et al., 2008). Enfin, ces travaux pourraient être à l'origine de développements biotechnologiques dans le cadre de la phytoremédiation de sols contaminés, en particulier la phytoextraction de métaux lourds.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Une analyse approfondie de la biodiversité végétale en Nouvelle-Calédonie ainsi qu'une compréhension détaillée des mécanismes de survie des plantes se développant sur sol ultramafique sont des enjeux majeurs tant au plan fondamental que finalisé. Lorsque ce travail de thèse a été initié, très peu de données écophysiologiques existaient sur les espèces du genre *Psychotria*, qui compte des espèces de tolérance très variable quant à l'élément nickel présent de manière abondante sur une partie notable des sols de la Grande Terre. De même, aucune donnée n'était disponible sur les mécanismes biochimiques et moléculaires de tolérance au nickel des graines de *P. douarrei*, l'espèce hyperaccumulatrice de référence. Aujourd'hui, notre travail d'écophysiologie de plusieurs espèces endémiques de la Nouvelle-Calédonie a permis d'une part d'approfondir nos connaissances sur ces espèces. D'autre part, plus de 600 protéines de la graine de *P. douarrei*, réparties entre les différentes classes albumines, globulines, prolamines et glutélines, ont été identifiées avec succès, en dépit des ressources génomiques très réduites dont on dispose sur ce modèle.

En ce qui concerne les travaux dédiés jusqu'alors à l'écologie des graines d'espèces de maquis minier de la Nouvelle-Calédonie, ceux-ci étaient rares et peu ont fait l'objet d'études très approfondies. Au cours de ces dernières années, une dynamique sur ce sujet s'est enclenchée entre l'Université de la Nouvelle-Calédonie et l'Institut Agronomique néo-Calédonien. Ce travail s'y inscrit et apporte des éclairages non négligeables sur le fonctionnement de cet écosystème au moment de la régénération par les graines de nouveaux individus.

Réponse aux facteurs climatiques

Ainsi, l'étude biologique de 45 graines d'espèces évoluant en milieu ultramafique a permis la réalisation de fiches descriptives détaillées répertoriant plusieurs caractéristiques des graines telles que leur structure, la composition de leurs réserves séminales ou encore leur conservation et l'identification des conditions optimales pour leur germination. Nous espérons que la disponibilité de ces fiches sera utile aux acteurs de la restauration écologique et notamment, à nos partenaires locaux dans ce domaine. Elles sont également la base de pistes de recherches complémentaires dans ce domaine pour les espèces que nous n'avons pas eu

l'occasion d'approfondir. A l'inverse, l'étude détaillée des graines de trois espèces phares de la restauration écologique néo-calédonienne (*Alphitonia neocaledonica, Gahnia aspera, Grevillea exul ssp. exul*) nous a permis de définir des caractéristiques importantes tant au niveau de la qualité des lots de graines, de leur germination et de leur dormance qu'au niveau de leur conservation donnant lieu à 2 publications soumises, une acceptée et une troisième potentielle sur *G. exul ssp. exul*. Outre les données fondamentales obtenues qui permettent d'expliquer les phénomènes de dormance en présence, ces résultats vont conduire à une utilisation optimale des graines de ces espèces dans les programmes de revégétalisation entrepris actuellement et qui sont voués à s'amplifier dans les prochaines années.

Les différents résultats obtenus de la caractérisation des 45 espèces étudiées permettent de mieux appréhender l'écologie des graines en milieu ultramafique et plus particulièrement en maquis minier. Cette étude constitue à notre connaissance la première étude approfondie dédiée à l'écologie des graines en milieu ultramafique néo-calédonien. Il en ressort, dans l'état actuel de nos connaissances, que deux stratégies adaptatives sont développées par les semences de ces milieux. Elles sont la résultante d'interrelations fortes entre différents traits majeurs, caractéristiques des graines des espèces évoluant sur maquis miniers.

Il serait prématuré à ce stade de nos travaux de restreindre les stratégies écologiques des graines du maquis minier à ces deux stratégies tant l'endémisme et la biodiversité au sein de ces milieux sont grands.

En tout état de cause et au regard de l'importance des stratégies que nous avons mises en évidence, ces dernières doivent être prises en compte dans l'établissement de la politique de restauration écologique néo-calédonienne. En effet, prévalant en milieu naturel, ces interrelations ont assuré et assurent encore l'équilibre des écosystèmes de la Nouvelle-Calédonie.

En perspective de cette analyse, des essais de restauration écologique et plus particulièrement d'ensemencement hydraulique devraient être entrepris mettant à profit les résultats que nous avons obtenus. En effet, le transfert des essais en laboratoire vers le milieu environnant est une étape clef et sa mise en place s'avère parfois délicate et nécessite notamment une grande rigueur dans le suivi des essais, ou la mise en place des protocoles appropriés. Par ailleurs, concernant les résultats de nos recherches, des essais sur le terrain ont d'ores et déjà été mis en place et sont actuellement en cours d'étude. La démarche que nous

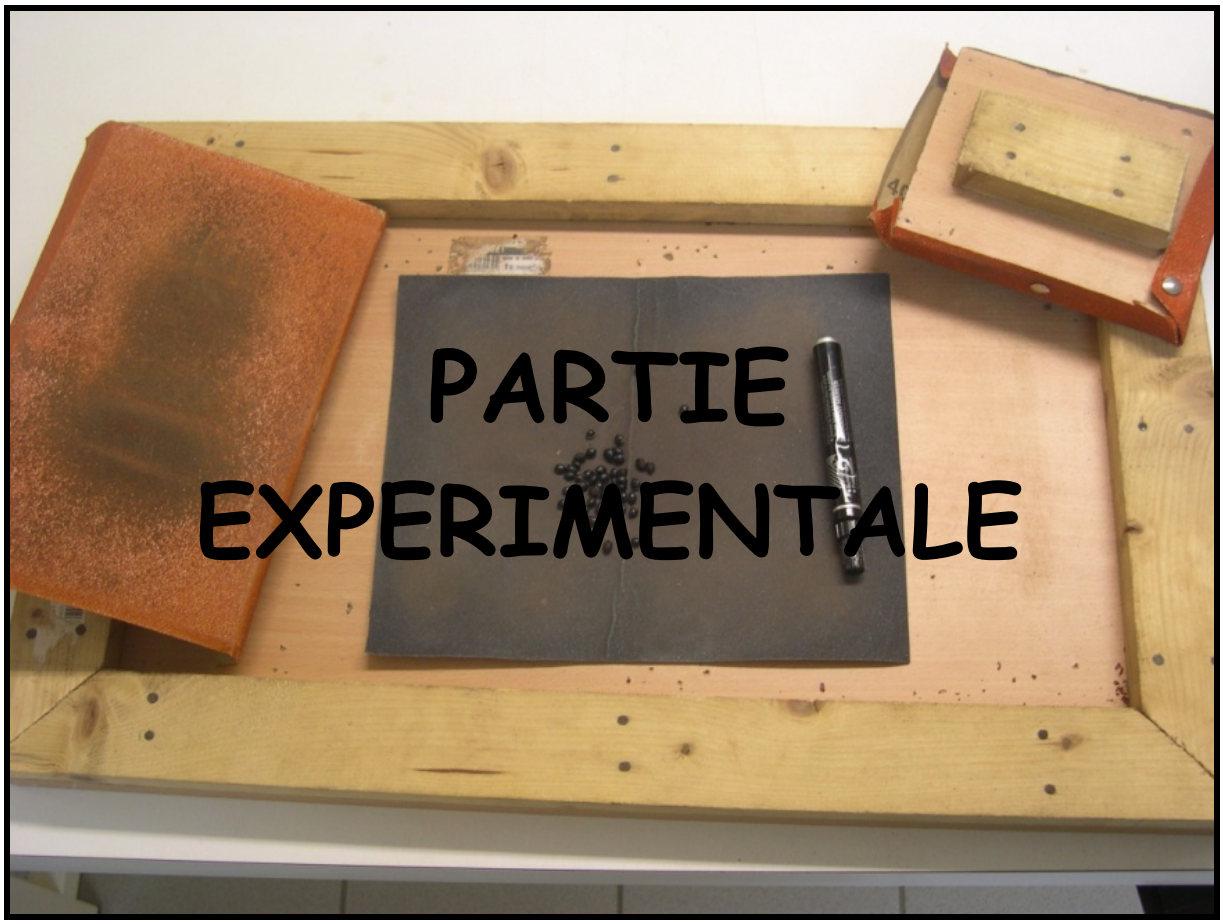
avons entreprise dans ce travail de recherche a donc permis de mieux définir les caractéristiques de quelques espèces traditionnellement utilisées dans la revégétalisation ainsi que d'appréhender les mécanismes biologiques et écologiques mis en place par les graines des espèces étudiées. Dans notre démarche, nous avons privilégié l'approfondissement des connaissances sur quelques espèces représentatives plutôt qu'un travail superficiel sur un plus grand nombre d'espèces. A ce stade, nous pensons que cette démarche reste à promouvoir et en particulier sur d'autres espèces évoluant en milieu ultramafique afin de confirmer les observations réalisées. De plus, il serait également intéressant d'étendre cette approche aux espèces forestières du milieu ultramafique. Un autre aspect de la mise en place de cette démarche au sein de plus nombreuses espèces serait la caractérisation d'éventuelles autres stratégies minoritaires mais dont le(s) rôle(s) serai(en)t tout aussi essentiel(s).

Réponses aux facteurs édaphiques

Les résultats acquis à l'issu de cette partie sont très originaux. Ainsi, l'étude éco-physiologique des graines de *P. douarrei* a permis de démontrer pour la première fois la tolérance au nickel des graines de cette espèce durant la phase germinative, ce qui confère à ces dernières un avantage incontestable au niveau de leur vigueur, car l'installation des plantules issues de la germination s'effectue au sein d'un milieu naturel riche en métaux lourds et tout particulièrement en nickel. L'étude de la répartition des éléments minéraux au sein de la graine a montré que la capacité à tolérer le nickel s'exprime par la mise en place d'un système entraînant la formation d'un gradient de nickel, en concentrations décroissantes depuis l'extérieur de la graine, protégeant ainsi l'embryon de l'effet toxique de ce métal. Cette étude a permis notamment de montrer l'efficacité de ce mécanisme grâce à la mise en évidence d'un élément nouveau chez les plantes, constitué de cristaux de sel de nickel qui participent vraisemblablement au piégeage de ce dernier. Enfin, l'étude protéomique que nous avons entreprise a permis de mettre en évidence des mécanismes nouveaux expliquant la tolérance observée. En effet, deux types de protéines du métabolisme du phosphate, les $P27^{SJ}$ et les GLP-Binding protein, toutes deux protéines de la famille DING, ont pu être identifiées et, sur ces bases, un mécanisme de tolérance au nickel a été proposé. Ce mécanisme est centré sur des transporteurs ABC (protéines DING) qui auraient pour rôle de filtrer le nickel à travers l'albumen ainsi que sur des protéines Germin-like qui réguleraient la germination. Ces avancées sont importantes dans la compréhension des mécanismes de tolérance au nickel. Toutefois, en perspective de nos travaux, des analyses doivent être approfondies dans la

caractérisation de l'élément chimique chélatant le nickel et permettant la cristallisation du métal. Une étude doit être aussi entreprise concernant la présence éventuelle de bactérie(s) (contaminantes ou commensales) au sein de nos graines afin de s'assurer de l'origine de nos protéines. La fabrication d'anticorps anti-peptides reconnaissant spécifiquement nos protéines DING permettrait de mener une étude sur la compartimentation de ces protéines au sein de la graine, mais également dans tous les organes de la plante et au cours du développement. L'étude de l'occurrence des protéines DING au sein de diverses espèces hyper-accumulatrices de nickel de la Nouvelle-Calédonie et d'ailleurs permettrait de lier ces mécanismes aux conditions édaphiques extrêmes prévalant en Nouvelle-Calédonie. Enfin, une étude concernant l'activité thérapeutique des protéines $P27^{SJ}$ devrait être initiée afin d'évaluer leur potentialité antivirale.

Les résultats acquis au cours de cette thèse contribuent à l'obtention d'informations massives sur les caractéristiques écophysiologiques et le protéome d'espèces endémiques de la Nouvelle-Calédonie. Cette question est d'actualité pour la préservation de la biodiversité végétale, véritable richesse de la Nouvelle-Calédonie, ainsi que pour la restauration des sols dégradés par l'activité minière. D'autre part la question de l'utilisation de plantes efficaces pour développer des activités de phytoremédiation et/ou de phytomining est au centre des préoccupations actuelles dans de nombreux pays industrialisés.


PARTIE
EXPERIMENTALE

I/ Matériel végétal

Les provenances des différents lots de semences sont multiples. Quelques lots ont été fournis par la SIRAS-Pacifique, entreprise de revégétalisation de la Nouvelle-Calédonie avec laquelle nous travaillons en étroite collaboration. D'autres lots ont été obtenus auprès du service de revégétalisation de l'entreprise minière Koniambo nickel SAS. Enfin, les autres proviennent de récoltes personnelles réalisées dans le milieu naturel au cours de ces quatre dernières années. Dans la mesure du possible, lors de la collecte, plusieurs informations essentielles sont relevées.

Le lieu de la collecte, avec si possible des points GPS, est noté, la description botanique de la plante est effectuée, cette dernière est photographiée et des échantillons d'herbier comprenant de préférence fleurs ou fruits sont collectés. Ces derniers permettront, si ce n'est pas déjà fait, une identification botanique de l'espèce considérée. Tout de suite après la récolte, les fruits sont traités (dépulpage des drupes, fruits secs déhiscents séchés sous un néon (30-34°C) afin de libérer les semences. Ces dernières sont ensuite séchées pendant au moins 24 heures sous les mêmes néons avant d'être stockés au froid sec à 4°C.

II/ Phénologie et distribution géographique

Les données concernant la phénologie des espèces et la distribution géographique de ces dernières ont été obtenues *via* une étude des herbiers du centre IRD (Institut de recherche et de développement) de Nouméa (NOU). Ces données sont aussi la résultante de nombreuses observations personnelles réalisées sur le terrain.

III/ Description de l'individu adulte

Lors des différentes sorties de terrain pour la collecte des graines, un échantillon botanique de l'individu adulte a été prélevé, des notes et des photos ont été prises sur les caractéristiques macroscopiques des parties foliaires, florales et/ou fructifères. Par ailleurs, des caractéristiques écologiques (type d'habitat, localisation) ont été reportées. Il nous a également été donné après comparaison avec nos échantillons d'accéder aux descriptions des espèces faites sur le site d'Endemia (http://www.endemia.nc).

IV/ Techniques et conseils de récolte/extraction et conditionnement des graines

En fonction des difficultés rencontrées au cours de la collecte des semences, des notes concernant la technique la plus idéale de collecte a conduit à la rédaction de conseils pour optimiser cette récolte. Il en a été de même en ce qui concerne le mode d'extraction des graines de leurs fruits.

V/ Taux d'humidité des semences

Immédiatement après avoir préparé les échantillons issus de la récolte ou après la réception des lots de semences au sein du laboratoire, 4 lots de 25 semences d'aspect fertiles sont triés, la teneur en eau de ces dernières est ensuite mesurée suivant le protocole utilisé par MacKay et al. (2002) et inspiré des procédures standards développées par l'International Seed Testing Association (ISTA, 1999) :

Quatre piluliers en verre numérotés sont séchés puis pesés (P1). Les échantillons de graines sont ensuite placés dans les piluliers non fermés qui sont de nouveau pesés (P2). Les piluliers sont ensuite placés à l'étuve à 103 ± 2°C pendant 17 ± 1h. Dès la sortie de l'étuve, ils sont alors placés dans un dessiccateur avec du gel de silice activé pendant 30 min. avant d'être de nouveau pesés (P3).

Le taux d'humidité des semences peut ensuite être calculé comme suit :

$$Taux\ d'humidité(THS) = \frac{[(P2 - P3) \times 100]}{(P2 - P1)}$$

VI/ Stockage des semences

Une fois le taux d'humidité calculé, les semences sont, soit directement mises en germination (cas des semences récalcitrantes), soit elles sont stockées au froid sec à 4°C (cas des semences orthodoxes et intermédiaires) jusqu'à leur utilisation.

VII/ Détermination du nombre de graine par unité de poids

Un échantillonnage de 5 répétitions de 100 grammes, 1 grammes ou 0,1 grammes selon la taille, la masse et l'effectif de l'échantillon concerné est réalisé. Les graines d'aspect impur et non fertiles sont éliminées. Les résultats sont exprimés en nombre de graines par gramme. De plus, la masse de 100 graines est également pesée.

VIII/ Description du fruit et de la semence

VIII.1/ Structure externe

Pour chacune des espèces, les fruits et les semences ont été décrits, mesurés et photographiés. Un minimum de 10 semences est considéré pour établir une caractéristique macroscopique.

VIII.2/ Structure interne

A partir d'un nombre de répétitions identique, les semences ont été coupées longitudinalement et transversalement afin de déterminer la taille, la forme et la position de l'embryon et des tissus de réserves. Ceci permet de définir le caractère albuminé ou exalbuminé de la semence.

VIII.3/ Ultrastructure

VIII.3.1/ Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage environnemental est une technique de haute performance permettant l'analyse élémentaire de structures de l'ordre du µm ou même du nm. On peut ainsi étudier avec précision la répartition des éléments minéraux au sein de différents tissus. Le principe est fondé sur l'émission d'un tir d'électrons accélérés par une différence de potentiel, le tir étant focalisé sur une zone définie. Cette méthode est destructive pour la zone

analysée (Léon, 2005). La sensibilité de l'appareil est importante. En effet, la teneur minimale de Ni détectable est de 0,05 – 0,1 % (en % de MS), soit 500 – 1000 ppm (L'Huillier, 1994 ; Psaras et Manetas, 2001). Ainsi, seules les graines traitées avec des solutions de concentration en Ni de 500 ppm peuvent être analysées convenablement. Les graines germées en présence d'eau servent de référence.

Les méthodes décrites par Léon et al. (2005) ont été utilisées. Les graines des différentes espèces analysées ont été découpées au niveau des zones d'intérêt. Les coupes ont été délicatement déposées dans un moule à cryomicrotome rempli d'un gel de fixation (Cryomount, Tissue-Teck® O.C.T.) en évitant la formation de bulle d'air. Le moule est ensuite plongé lentement dans de l'azote liquide pour figer l'ensemble. Des coupes longitudinales de 40 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryomicrotome (Cryo-cut II microtome Reichert-Jung). Les coupes sont immédiatement placées sur un plot du MEB et stockées à -32°C jusqu'à ce que les coupes soient métallisées au carbone sur 10-15 nm d'épaisseur à l'aide d'un métalliseur au carbone (Cressington 108A). Une fois métallisées, les coupes peuvent être conservées jusqu'à leur observation à l'aide d'un microscope ESEM Philips XL 30 équipé d'un détecteur de rayons X à énergie dispersive (EDS). Les spectres d'analyses élémentaires sont obtenus par l'analyse point par point en excluant le C et O, en trop forte quantité dans les matériaux organiques, des pourcentages de normalisation. 5 échantillons sont systématiquement analysés. Les résultats des analyses élémentaires sont exprimés en pourcentage de l'élément considéré par rapport à la masse de matière sèche analysée. Les cartographies élémentaires au rayon X sont menées durant 2 à 4 heures afin d'obtenir une distribution satisfaisante de chaque élément cité ci-après (C, O, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Mn et Ni).

Dans tous les cas de figure, la tension d'accélération est de 20 kV. Les images électroniques sont obtenues selon deux modes, un mode rétrodiffusé (mode BSE) et un mode secondaire (SE) dont les caractéristiques ont été données dans la partie II.8.3.a du chapitre 1.

Des analyses statistiques des points de relevés en surface et au niveau des coupes de graines ont été menées à l'aide du logiciel JMP-IN de la SAS institute (Cary, NC, USA). Les différences significatives obtenues après un test de student test ($P \leq 0.05$) sont indiquées dans les tableaux de résultats.

Des analyses ICP-OES (Spectromètre à émision atomique) des différentes parties de la plante ainsi que du sol ont été menées au laboratoire de chimie du centre IRD de Nouméa. Les quantités totales de Ni, Mn, Ca, Mg, K, Cl, S du sol, des feuilles, des tiges, des racines, du fruit entier ainsi que de la partie pulpeuse (exocarpe et mesocarpe) et de la graine (endocarpe + graine *stricto sensu*) ont été déterminées selon la méthode de Lindsay et Norvell (1978), à l'aide d'une ICP-OES. Les résultats sont exprimés selon leurs valeurs moyennes en $\mu g.g^{-1}$ de la matière sèche. Afin de mesurer la biodisponibilité du Ni, Mn, Mg, K et P, une extraction chimique est menée selon la méthode de Lindsay et Norvell (1978) modifiée par Bourdon et al. (1997) : Une solution de DTPA à 0,005 M et de $CaCl_2$ à 0,01 M est préparée dans de la solution de sol selon un ratio 1/5 (v/m). Cette dernière est analysée pour les éléments cités ci-dessus avec l'ICP-OES. Cette méthode va permettre d'analyser les métaux adsorbés ou complexés dans la phase organique du sol ou la phase minérale de cette dernière.

L'ensemble de ces manipulations a été réalisé au sein du Service Commun de Microscopie Electronique de l'Université de Provence, Marseille, France.

VIII.3.2/ Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Les semences sont préparées et analysées selon le protocole appliqué par McGill et al. (2002). Les parties des semences à analyser sont découpées en échantillons de 1-2 mm^2. Ces dernières sont ensuite fixées successivement dans deux solutions fixatrices (solution de 3% glutaraldéhyde (v/v) et de 2% formaldéhyde (v/v), tamponnées dans du 0,1M de tampon phosphate à pH 7,2 et solution de 1% d'osmium tétroxide (OsO_4) (w/v) dans du tampon phosphate (0,1M). Les échantillons sont par la suite déshydratés dans une série de concentrations croissantes d'acétone avant d'être coulés dans une résine (ProcureTM 812 époxy résine). Les échantillons sont enrobés d'une résine fraiche dans un moule en silicone puis séchés pendant 48 heures à 60°C. Des fragments de 1 µm sont coupés du bloc séché puis montés à chaud entre lame et lamelle afin d'être observés en microscopie optique après coloration avec une solution de bleu de toluidine à 0,05% dans un tampon phosphate 0.1 M.

Une fois les zones d'intérêts repérées par microcopie optique, les blocs sont taillés et des sections de 90 nm sont coupées pour la microscopie électronique. Les sections sont enfin doublement colorées avec de l'acétate d'uranyle saturé dans 50% d'éthanol (v/v) et du citrate

de plomb. Les sections sont alors observées et photographiées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Philips Z01C.

L'ensemble de ces manipulations a été réalisé au sein du « Manawatu Microscopy & Imaging Centre, Institute of Molecular Biosciences » de l'université de Massey, Palmerston North en Nouvelle-Zélande.

IX/ Composition biochimique des réserves séminales

Les différents protocoles décrits ci-dessous ont été sélectionnés du fait de leur simplicité en termes de dispositif expérimental et de la facilité à les mettre en œuvre. En effet, l'objectif n'est pas d'étudier en profondeur la composition biochimique des réserves séminales, mais il est d'appréhender la proportion des grandes familles de réserves séminales (Protéines, Lipides neutres, Glucides hydrosolubles, Amidon) afin de définir les types de semences auxquels nous avons à faire (Protéagineuse, Oléagineuse, Amylacées). Ces caractéristiques sont en effet étroitement liées aux conditions optimales de stockage, à la teneur en eau des semences, à l'orthodoxie… Ces différentes expérimentations ont ainsi été réalisées en routine sur les 45 espèces dès que cela était possible (quantité de semences disponibles suffisante, qualité des différents lots satisfaisants…).

IX.1/ Teneur en protéine totale

Les protéines totales sont extraites à froid (4°C) selon leur solubilité dans différents solvants. 5 répétitions de 50 mg de semences sont broyées à l'aide d'un broyeur à graines. Une série de solvant est alors appliquée afin d'obtenir les différentes familles des réserves séminales protéiques qui sont quantifiées et additionnées afin d'obtenir la fraction protéique totale des réserves. L'eau distillée est utilisée pour extraire la fraction albumine, le chlorure de sodium (5%) pour la fraction globuline, l'éthanol (60%) pour la fraction prolamine et enfin de la soude (0,4%) pour les glutélines. Chaque extrait est centrifugé à 20 000g à 4°C pendant 20 min (Garcia-Agustin et Primo-Millo, 1989). Le surnageant est alors récupéré pour la quantification. La teneur en protéine est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Lowry

et al., 1951) à 750 nm et calculée à partir d'une courbe standard obtenue de l'albumine du sérum de bovin. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique de la matière sèche.

IX.2/ Teneur en lipide neutre

Le protocole est adapté de la méthode appliquée par Griffiths et al. (2000). Cinq répétitions de 1 à 2 g de semences sont finement broyées dans un broyeur à graines. Les broyats sont humidifiés avec 3,5 mL d'eau distillée. 10 mL de méthanol contenant 0,02% d'hydroxytoluène butylé sont ajoutés puis le tout est homogénéisé. 15 mL de chloroforme sont ajoutés sous agitation pendant 15 min. Le mélange est filtré et le filtrat est mis de côté. La poudre est alors épuisée de nouveau avec 10 mL de chloroforme sous agitation pendant 5 min avant d'être filtrée une deuxième fois. Les deux filtrats sont alors réunis avant d'être centrifugés à 2500 rpm. La phase supérieure est éliminée et 0,2 mL d'eau distillée est ajouté. Le tout est centrifugé puis la phase supérieure est proprement éliminée. La phase lipidique récupérée est évaporée dans un évaporateur rotatif avec un bain marie à 30°C. Une fois séché, les lipides neutres sont pesés et exprimés en pourcentage massique de la matière sèche.

IX.3/ Teneur en glucides hydrosoluble

La méthode employée est adaptée de la méthode de Roe (1955). Quatre répétitions de 20 mg de semence sont finement broyées à l'aide d'un broyeur à graine. 1 mL d'eau distillée est ajouté et le tout est incubé à 45°C pendant 1 heure. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 5000 rpm pendant 15 min à 25°C. Le surnageant est alors mis de coté avec précaution. 100 µL d'eau distillée est mélangée avec 100 µL d'extrait aqueux. 2 mL de réactif à l'anthrone est ajouté et homogénéisé. Tous les échantillons sont placés dans un bain marie à 95°C pendant 10 min, puis 10 min dans de l'eau glacée et enfin 10 min à température ambiante (20-25°C). Enfin, 4 mL de H_2SO_4 (70%) sont ajoutés. Les glucides hydrosolubles sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre à 635 nm.

Les résultats sont déduits d'une courbe standard réalisée à partir de D+-glucose et exprimés en pourcentage massique de la matière sèche.

IX.4/ Teneur en amidon

L'analyse de la teneur en amidon est réalisée à l'aide d'un kit standard d'analyse d'amidon fourni par sigma (Code produit SA-20). L'analyse de l'amidon est basée sur des réactions enzymatiques qui ont pour conséquence une augmentation de l'absorbance à 340 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique de la matière sèche.

IX.5/ Teneur en acide gras des lipides neutres

De rapides constatations concernant des teneurs élevées de la fraction lipidique de différentes réserves séminales ont excité notre intérêt quant à la composition de ces différentes fractions lipidiques. Ainsi, quand l'expérimentation fût possible, la teneur et la composition en acide gras des fractions de lipides neutres ont été étudiées suivant les protocoles développés ci-dessous.

IX.5.1/ Préparation de la fraction lipidique neutre

Afin de réaliser l'analyse des acides gras, la fraction lipidique est obtenu *via* un protocole différent de celui proposé ci-dessus, un lot de semence est séché et broyé finement. 10 g sont extraits en continu à l'aide d'un soxhlet avec du *n*-hexane jusqu'à épuisement.

IX.5.2/ Préparation des dérivés d'esters méthyliques d'acides gras (FAMEs)

Les esters méthyliques d'acide gras sont préparés par reflux d'1 g de lipide neutre dans 10 mL de méthanolate de sodium (4 g de soude dans 100 mL de méthanol), pendant 1 h. Après addition de 10 mL d'eau, les dérivés d'esters méthyliques d'acides gras sont extraits une seconde fois avec 10 mL de n-pentane. La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif.

IX.5.3/ Préparation des diméthyldisulfide (DMDS) dérivés des esters méthyliques d'acides gras (FAMEs)

Approximativement 100 mg de FAMEs dissouts dans 5 mL d'heptane réagissent avec 5 ml de DMDS et 1 mL de solution d'iodine (1,2 mg de diiode dans 20 µL de diéthyléther)

pendant 24 h à température ambiante. Le mélange est ensuite dilué avec 10 mL d'heptane et l'iodine est éliminé en agitant avec du thiosulfate de soude (5%). Les DMDS sont récupérés et stockés jusqu'à leur utilisation.

IX.5.4/ Préparation des dérivés 4,4-diméthyl oxazoline (DMOX) d'acide gras libre

Les acides gras libres sont obtenus de la fraction lipidique neutre par saponification avec 100 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (2N). Après reflux pendant 1 h, 100 mL d'eau sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite avec 3×40 mL de pentane. La phase organique qui contient la fraction insaponifiable est lavée avec de l'eau puis séchée à l'aide de sulfate de magnésium. La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl (2N) et extraite avec 3×50 mL de chloroforme afin d'obtenir les acides gras libres.

50 mg des acides gras libres dissouts dans 1 mL de chlorure de méthylène sont ajoutés à 60 mg de dicyclohexylcarbodiimide dissouts lui même dans 1 mL de chlorure de méthylène et agité pendant 10 min à l'aide d'un agitateur magnétique. Ensuite, 60 mL de 2-amino-2-méthyl-1-propanol sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 4 h à température ambiante. Le réactif en excès est alors évaporé. Du diethyléther et 500 µl de $SOCl_2$ sont ajoutés durant 30 min à 0°C sous agitation continu. La solution est ensuite agitée pendant encore 30 min à température ambiante. Enfin, 7 mL d'eau sont ajoutés et la solution est lavée avec du carbonate de soude. Les dérivés de DMOX sont obtenus et analysés par la suite.

IX.5.5/ Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées sur un appareil de type Varian 3800 équipé d'une colonne capillaire MEGA 10 (30 m ; 0,32 d.i. ; 0,25 µm d'épaisseur), et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les échantillons sont injectés manuellement dans un four. La température du four est programmée comme suit :
Température initiale : 150°C, gradient de température : 2°C.min^{-1} incrémentés à 220°C, les températures d'injection et de détection sont de 230°C et 240°C respectivement. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à une pression interne de 0,4 Bar.

Chaque acide gras est exprimé en pourcentage de la proportion relative par rapport à la somme de tous les acides gras intégrés.

IX.5.6/ Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS)

Les analyses CPG-MS sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 équipé d'une colonne capillaire DB-5MS (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm (J&W Scientific Inc.)) couplé à un spectromètre quadripolaire HP 5989 A fonctionnant en mode d'ionisation électronique (EI 70eV), avec une température de transfert à 295°C et une température source de 240°C.

Les échantillons sont injectés dans du chlorure de méthylène. Le programme de la température du four est défini comme suit : 1 min à 30°C, de 30°C à 70°C à 5°C.min^{-1}, puis de 70°C à 120°C à 10°C.min^{-1}, et 120°C à 290°C à 2°C.min^{-1}, et enfin 40 minutes à 290°C. La température d'injection est de 295°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à un débit de 1 ml.min^{-1}, et 17,8 psi.

IX.5.7/ Analyse IRTF (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier)

Les spectres ont été analysés de 4000 cm^{-1} à 650 cm^{-1}, avec 4 cm^{-1} de résolution et 100 scans et ont été enregistrés sur un spectromètre « Nicolet Avatar », équipé d'un détecteur DGTS, une source Ever-Glo et d'un diviseur de faisceau KBr/Germanium. Les échantillons sont déposés sans préparation. L'air est pris comme référence pour le bruit de fond des spectres.

X/ Test d'imbibition

Des lots identiques d'un nombre suffisant de graines sont pesés, déposés durant 5 minutes dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre contenant 2 papiers de germination humidifiés. Les graines sont ensuite séchées à l'aide de papier adsorbant avant d'être repesées. Une partie des répétitions de graine est soumise au traitement levant la dormance préalablement identifiée et propre à chaque espèce avant d'être replacée dans les boîtes de Pétri afin d'être re-humidifiée. Les semences traitées et les semences non traitées (Témoin) sont retirées des boîtes de Pétri à intervalle régulier puis pesées en appliquant le même protocole.

XI/ Taux de viabilité

Ce test a pour but de déterminer les potentialités germinatives du lot considéré. Le principe est de couper les semences en deux et de les plonger dans une solution de chlorure de tétrazolium. Lorsque les tissus sont vivants, une coloration rose apparaît car ils respirent. Les enzymes de la respiration (réductases) sont actives et permettent la réduction des cofacteurs ($NADPH+H^+$, $NADH + H^+$ et $FADH +H^+$) ainsi que la réduction du sel. Le sel de tétrazolium oxydé a une couleur jaune et lorsqu'il est réduit, une coloration rose apparaît. L'intensité de la couleur est également observée.

En général, quatre lots de 25 graines sont prélevés au hasard. Ces lots sont par la suite incubés dans 4 boîtes de Pétri remplies d'eau pendant 24 h à 20°C, à l'obscurité. Puis on procède à une incubation des lots de graines dans des boîtes de Pétri contenant de la solution

aqueuse à 1% de 2,3,5 triphényl-tétrazolium chloride (TTC) pendant 24 h à 20°C et à l'obscurité. Les semences sont ensuite coupées puis déposées dans des boîtes de Pétri comportant du papier Whatman imbibé de solution de TTC pendant 24 h à l'obscurité. Enfin s'effectue l'observation de la coloration de la radicule et des cotylédons. Si la coloration est rouge uniforme, la semence est viable. Si la coloration est non uniforme, la semence est non viable.

XII/ Tests de germination

Les essais de germination constituent une source de données importante quant à la qualité physiologique des semences. Les résultats des essais de germination sont souvent utilisés pour calculer la quantité de graines à semer pour obtenir un nombre donné de plants. Il s'agit au cours de ces essais de déterminer l'influence de différents traitements sur la germination des semences étudiées. Les différents traitements choisis correspondent à des techniques simples, applicables à des quantités de semences importantes, et à faibles coûts.

Les résultats sont exprimés sous forme de courbes de germination : elles expriment l'évolution du pourcentage cumulé de semences germées en fonction du temps, elles permettent de montrer l'évolution complète de la germination d'un lot de semences placées dans des conditions déterminées.

Deux autres grandeurs sont utilisées :

- le temps de latence qui correspond au temps compris entre le début du test de germination et le moment où la première semence germe.
- le pourcentage maximal de germination atteint après un certain temps (40 ou 60 jours d'observation maximum), avec des relevés de germination réalisés tous les 2 jours.

Les semences sont mises à germer dans des boîtes de Pétri en verre de 9 cm de diamètre garnies de deux papiers de germination ou de coton hydrophile, préalablement stérilisés à l'autoclave. Après l'ajout d'une quantité suffisante d'eau distillée stérile, un lot de 100 semences est réparti sur 4 boîtes (soit 25 graines par boîte), dans certains cas sur 3 boîtes

en raison d'une quantité limitée de semences. Les boîtes de Pétri sont fermées, avant d'être incubées à la température désirée. Les graines ont une de leur face au contact du papier filtre, position admise comme étant la plus idéale à la germination (Côme, 1975). La germination est considérée comme effective dès l'observation de l'émergence de la radicule sur une longueur de 1 mm (Istambouli, 1976 ; Aissa, 1981).

XII.1/ Désinfection

En premier lieu, les semences sont désinfectées dans un bain d'hypochlorite de sodium à 4% (eau de Javel à 48° chloré pure) pendant 5 minutes suivis de 4 rinçages de 10 minutes à l'eau distillée stérile sous hotte à flux laminaire horizontal.

XII.2/ Différents traitements pour la levée de dormance

Les différents traitements utilisés ont été adaptés de ceux appliqués par Fogliani (2002). Ils ont ensuite été optimisés et améliorés au cours de ces quatre années de doctorat. L'ensemble de ces traitements a aussi été complété par divers traitements jugés potentiellement efficaces envers les semences de la Nouvelle-Calédonie collectés dans la bibliographie, tout au long des nombreuses participations à des missions de recherches dans des laboratoires extérieurs et aux différents colloques et conférences nationales et internationales.

XII.2.1/ Effet de la lumière sur la germination

L'effet de la lumière sur la germination des semences est étudié en plaçant respectivement un lot de semences désinfectées à la lumière, un autre lot à l'obscurité, à 25°C. Les boîtes de Pétri incubées à la lumière et à l'obscurité sont considérées dans cette étude comme des témoins, puisque les semences ne subissent pas de prétraitements.

XII.2.2/ Effet d'un traitement à l'eau chaude sur la germination

Pour déterminer l'effet de l'eau chaude sur la capacité germinative des semences, après avoir été désinfectées, les semences sont trempées dans de l'eau chauffée à 50, 60,70, 80, 90 ou 100°C pendant 12 heures (overnight) jusqu'à ce que l'eau soit redescendue à température ambiante. Elles sont enfin mises à germer à 25°C.

XII.2.3/ Effet d'un traitement à l'eau bouillante sur la germination

Les semences sont plongées dans de l'eau bouillante pendant 1, 2 ou 5 minutes. Elles sont ensuite refroidies dans de l'eau distillée stérile, séchées puis mises à germer à 25°C.

XII.2.4/ Effet de la scarification mécanique sur la germination

Pour étudier l'effet de la scarification mécanique sur les semences, deux méthodes sont employées, soit les semences sont scarifiées entre deux papiers de verre de taille différentes (P60 et P100) montés sur un système à scarification manuelle au papier de verre (Figure 75), soit des petits fragments d'enveloppes séminales sont coupés à l'aide d'un scalpel. Ainsi, un nombre de répétitions identiques de semences sont scarifiées au papier de verre ou au scalpel après avoir subi une désinfection sous la hotte à flux laminaire. Les semences sont ensuite mises à germer à 25°C.

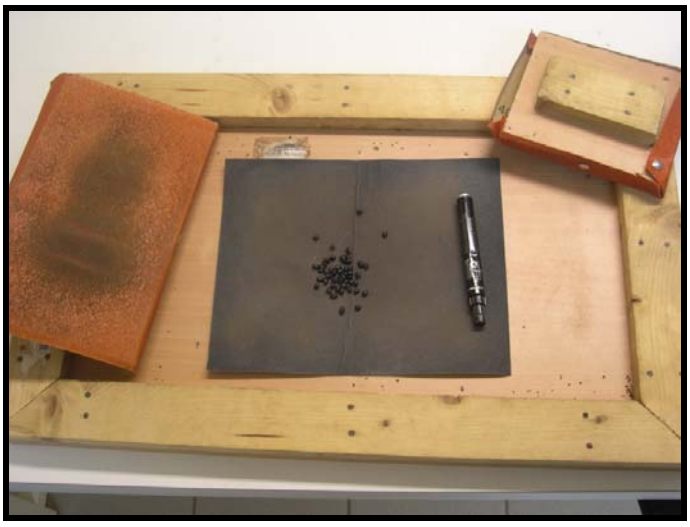


Figure 72 : Dispositif de la scarification au papier de verre

XII.2.5/ Effet d'un traitement à l'acide sulfurique sur la germination

Après avoir été désinfectées, les graines sont trempées respectivement pendant 1, 2 ou 5 minutes dans de l'acide sulfurique 98% dilué au ¼. Suite à ce traitement, elles sont abondamment rincées à l'eau distillée stérile, puis sont mises à germer dans des boîtes de Pétri à 25°C.

XII.2.6/ Effet d'un traitement à l'eau fumigée sur la germination

Les graines après avoir été désinfectées sont trempées respectivement pendant 6, 12 ou 24 heures dans de l'eau fumigée à 1% (Regen 2000 Smokemaster). Puis elles sont mises à germer dans des boîtes de Pétri à 25°C. Les semences constituées de téguments importants et visiblement imperméables sont préalablement scarifiées au papier de verre ou au scalpel.

XII.2.7/ Effet d'un traitement à l'acide gibbérellique

Après désinfection, les semences sont trempées dans une solution de GA_3 à 0,3g/L pendant un temps allant de 12 heures à 48 heures. Les semences sont ensuite mises à germer dans des boîtes de Pétri à 25°C.

XII.2.8/ Effet d'un traitement par le froid

Après désinfection, les semences sont trempées dans 20 mL d'eau distillée stérile puis placées dans un réfrigérateur à 4°C pendant 7, 14, ou 21 jours. Les semences sont ensuite mises à germer à 25°C.

XII.2.9/ Effet d'un traitement de pourrissement

Il s'agit de déterminer l'effet d'un pourrissement de 2 mois sur quelques semences. Les graines sont plongées dans de l'eau distillée dans des pots laissés ouverts et ceci pendant 2 mois. Les graines sont par la suite mises à germer dans une étuve à 25°C.

XII.3/ Température optimale de germination

S'agissant de graines dormantes, une fois le traitement levant la dormance des semences identifié, les conditions optimales de germination en terme de température ont été étudiées. Les semences sont donc, principalement mises à germer dans des étuves à différentes températures (15, 20, 25, 30 et 35°C) réglées à une photopériode de 12 heures et une alternance température de 22/29°C.

XIII/ Tests de conservation

Pour ce qui concerne les tests de conservation, une seule espèce a pu être testée par manque de semences et du fait de la mauvaise qualité des semences disponibles des autres espèces. Le test de conservation a donc été uniquement été mené sur les semences *Gahnia aspera* (R. Br.) Spengel.

Les semences de *Gahnia aspera* sont conservées en boîtes hermétiques à deux taux d'humidité différents, 5% (obtenu à l'aide de gel de silice activé) et 11-12% (grâce à une solution saturée de chlorure de lithium) et à trois températures différentes, 4°C, 15°C et à température ambiante (20-25°C).

La viabilité des lots et la germination des graines sont mesurées tous les deux mois pendant les 8 premiers mois puis tous les 3 mois par la suite. Trois répétitions de 10 semences pour la viabilité et trois répétitions de 25 semences pour la germination sont retirées des boîtes hermétiques de stockage, les trois répétitions de semences pour la germination sont scarifiées au papier de verre (traitement levant la dormance de *G. aspera*), rincées abondamment avant d'être mises à germer à 25°C.

XIV/ Etude protéomique

XIV.1/ Extraction des protéines

L'extraction selon Osborne (1924) (Figure 73) (Shewry et Casey, 1999 ; Catusse et al., 2008) est la méthode de référence concernant les protéines des graines. Cette méthode permet d'extraire successivement quatre grandes classes de protéines selon leur solubilité dans différents solvants. Ainsi, on obtient les albumines dans l'eau, les globulines dans les sels, les

prolamines dans l'alcool et les glutélines dans la soude. Les globulines, prolamines et glutélines sont les protéines de réserve de la graine utilisées pour le redémarrage du métabolisme lors des premières phases de croissance de la plantule (Black et Bewley, 2006). Les albumines correspondent à l'ensemble des protéines hydrosolubles de la cellule et, en particulier, aux enzymes du métabolisme.

Toutes les manipulations ont été réalisées à 4°C, sauf indication contraire. L'endocarpe des graines est ôté et ces dernières sont placées à –80°C pendant 15 min avant un broyage fin par agitation dans un support de broyage contenant des billes métalliques pendant 3 min. La poudre est pesée puis mélangée avec 5 mL d'eau MilliQ contenant des inhibiteurs de protéase pendant 15 min en chambre froide. La suspension est centrifugée (Sigma type 3K30) pendant 15 min à 15000 *g* à 4°C. Le surnageant contenant les albumines est récupéré. Trois lavages du précipité ont été effectués avec 5 mL d'eau MilliQ puis le culot a été solubilisé avec 5 mL de NaCl 5% (p/v), sous agitation pendant 15 min. Après centrifugation (15000 *g* ; 15 min), le surnageant contenant les globulines a été recueilli et le culot lavé de la même manière que précédemment mais avec du NaCl 5%. La troisième extraction a été réalisée comme les deux autres, mais avec un mélange éthanol:eau 60:40 v:v. Le surnageant contenant les prolamines a été récupéré puis le culot a été lavé trois fois à l'éthanol pour être ensuite solubilisé dans 5 mL de NaOH à 0,4% (p/v). Après centrifugation, le surnageant contenant les glutélines a été récupéré. Pour concentrer les protéines et éliminer des contaminants interférant avec l'électrophorèse (ex : les polyphénols), les quatre fractions protéiques obtenues ont été précipitées pendant la nuit à –20°C après ajout d'un volume d'un mélange acide trichloroacétique (TCA) 20% / acétone 80% contenant du 1,4-dithiothréitol (DTT) à 1 mM. Après précipitation, les échantillons ont été centrifugés (15000 *g*, 15 min) puis les culots ont été lavés deux fois avec 500 µL puis 200 µL d'une solution constituée d'acétone et de DTT 1 mM.

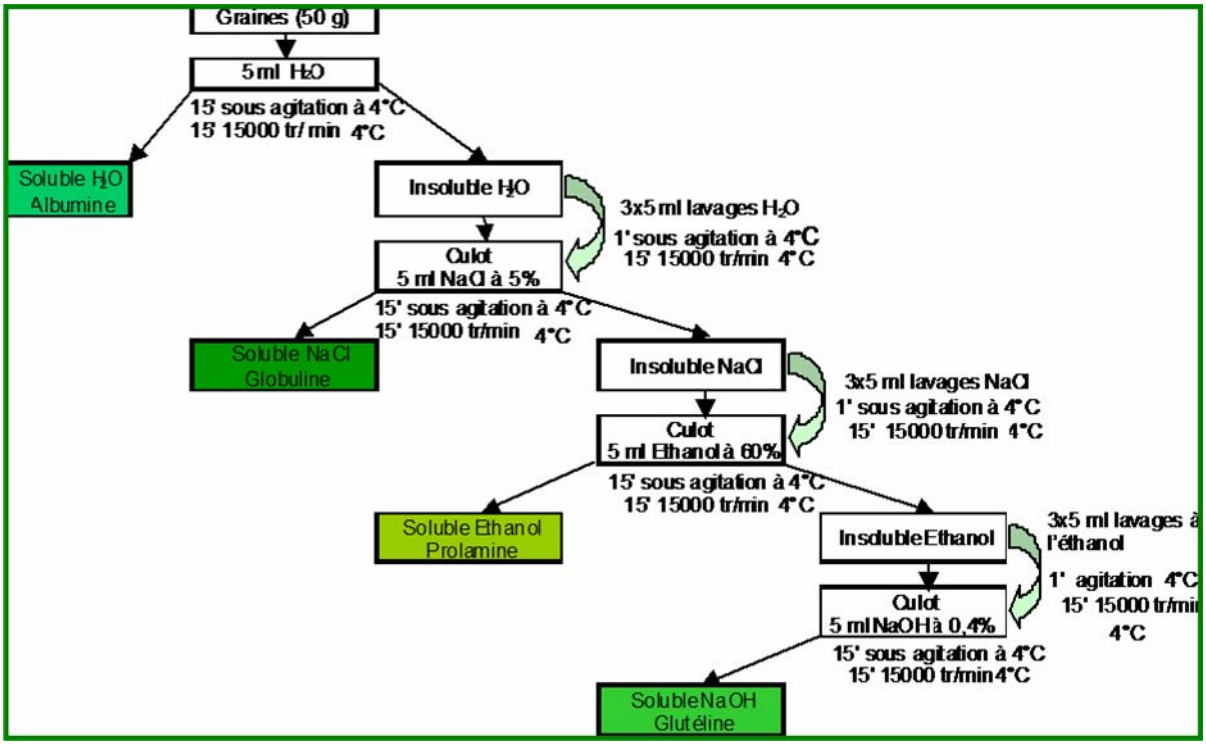


Figure 73 : Déroulement du protocole d'extraction des protéines selon la méthode d'Osborne

Les culots ainsi lavés ont été séchés sous hotte puis repris dans un volume de tampon de réhydratation permettant d'obtenir une concentration finale en protéine d'environ 5µg/µL. Le tampon de réhydratation est constitué de 25 mL d'eau, 21 g d'urée (~7M), 7,6 g de thiourée (~2M), 2 g de CHAPS, 0,5 mL d'ampholites à 1%, 1 mL de Triton 100X et de quelques gouttes de bleu de bromophénol. Le DTT est rajouté extemporanément à raison de 1 g pour 50 ml de tampon.

XIV.2/ Dosage des protéines

Le dosage des protéines extraites s'effectue grâce à une réaction colorimétrique avec un réactif Biorad (Protein assay reagent) dilué au 1/5ème. Une gamme étalon de sérum d'albumine bovine (BSA) est d'abord préparée à partir d'une solution mère de concentration connue à 40 mg/mL et la densité optique de chaque dilution est mesurée à 595 nm. La droite Absorbance = f(Concentration) est établie. Ensuite, l'absorbance des différents extraits est mesurée afin d'en déduire la concentration en protéines. Deux dosages distincts sont effectués, le dosage avant précipitation au TCA et le dosage déterminant la concentration finale réelle en protéines.

XIV.3/ Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis)

Les échantillons, dont les concentrations protéiques sont connues, sont dilués dans du tampon de charge afin d'obtenir une concentration de 1µg/µL. Dix µL de chaque échantillon et 5 µL d'un marqueur de taille Biorad sont déposés dans les puits du gel (Tableau 18) qui se compose comme suit : la solution d'acrylamide est composée de 1,1 mL d'un mélange acrylamide/ PDA (Pipérazine diacrylate) (100 mL/1,33 g), de 0,6 mL de TrisHCl 1N à pH 8,3 et de 2,3 mL d'eau. La solution de «stacking» est constituée de 0,17 mL d'un mélange acrylamide/PDA (100 mL/1,33 g) ; de 0,25 mL de Tris-HCl 1N à pH 6,8 ; de 0,58 mL d'eau et 10 µL de SDS 10%.
La migration s'effectue en tampon Taurine 1X + 0,1 % de SDS.

Tableau 21 : Caractéristiques des différents gels utilisés pour l'électrophorèse SDS-PAGE

	Acrylamide 10%	**Solution de stacking**	**APS 25%**	**Temed**
Gel de migration	4 mL		8 µL	4 µL
Polymérisation avec de l'isopropanol en surface				
Gel de concentration		1 mL	4 µL	2 µL

a/ Coloration au GelCode®

Les gels sont lavés cinq fois dans de l'eau MilliQ pendant 5 min puis mis en présence de la solution de GelCode pendant un temps maximal d'1h. Les gels sont relavés avec une solution de glycérol à 5%, jusqu'à ce que le fond s'éclaircisse, puis séchés.

b/ Electrophorèse 2D

- **Réhydratation passive**

Pour effectuer la première dimension (isoélectrofocalisation), les «strips» (bandelettes de gel de polyacrylamide contenant un gradient de pH immobilisé ; 18 cm ; gamme pH 3-10 non linéaire) sont mis en présence, gel dessous, de 340 µL de la solution contenant l'échantillon et le tampon de réhydratation. La cassette contenant les strips est recouverte d'huile et placée dans l'appareil à 22°C pour toute la nuit.

- **Isoélectrofocalisation**

Les strips sont déposées dans une nouvelle cassette après élimination de l'huile avec la face gel au dessus. Du papier filtre épais abondamment imbibé d'eau MilliQ est déposé à chaque extrémité des strips puis les électrodes sont disposées par dessus. Avant le dépôt de la cassette dans l'appareil, quelques gouttes de kérosène sont ajoutées sur la plaque. Après ajout d'huile, le programme de migration est lancé avec une première étape d'une heure à 300V-2mA et 5W suivie par une migration à 3500V-2mA et 5W pendant 7H.

- **Equilibration**

Une solution d'équilibration est préparée avec 37,5 mL de tampon de stacking 8X, 90 mL de glycérol, 50 mL d'eau MilliQ, 75 mL de SDS 10% et 109,8 g d'urée sous agitation. Le tampon de stacking correspond à 251 g de bis-tris avec 800 mL d'HCl qsp 1L d'eau. L'équilibration commence par l'ajout d'une solution de 100 mL de tampon d'équilibration avec 1 g de dithiothréitol (DTT) aux strips pendant 20 min sous agitation. Les strips sont ensuite lavées deux fois pendant 1 min avec 50 mL du tampon d'équilibration. Au final, 100 mL de tampon contenant 4 g d'iodoacétamide (IAM) sont ajoutés pendant 20 min sous agitation. Les strips sont finalement relavées pendant 1 min avec du tampon de migration. Après cette étape, les strips peuvent être conservées à –80°C ou être déposées en seconde dimension.

- **SDS-PAGE**

Vingt-cinq gels peuvent être préparés simultanément, ce qui correspond à préparer une solution contenant 1 L d'eau MilliQ dégazée avec 400 mL d'acrylamide /PDA (13,3 g de PDA dans 1 L d'une solution stock d'acrylamide 40%) puis 266 mL de tampon Trizma/HCl à pH 8,3 (130 g de Trizma + 600 mL HCl pur qsp 1L H_2O). Les 1,4 g d'APS (ammonium persulfate) dans 10 mL d'eau MilliQ ainsi que les 665 µL de Temed sont rajoutés extemporanément. Les gels sont coulés puis polymérisés pendant 1h.

La migration en 2D s'effectue dans 20 L de tampon taurine qui contiennent 500 g de taurine, 60 g de trizma dilué dans 1 L d'eau, 200 mL de SDS 10% et complété à l'eau. Avant le dépôt des strips sur le haut des gels, de l'agarose est ajouté. Pour 200 mL de cette solution, 25 mL de tampon stacking 8X, 8 mL de SDS 10% et 2 g d'agarose LMP (Low melting point) sont mis sous agitation et chauffage. Une fois les strips mises en place et l'agarose refroidi,

les plaques sont disposées dans la cuve et la migration est lancée toute la nuit à un ampérage en fonction du temps et du nombre de gels.

c/ Révélation à l'argent

La fixation s'effectue pendant 1h dans une solution contenant de l'éthanol et de l'acide acétique concentré (600 mL et 100 mL qsp 2 L avec de l'eau) et est suivie par un lavage à l'eau MilliQ pendant 5 min puis trois lavages de 10 min. Les gels sont ensuite sensibilisés avec le thiosulfate de sodium pendant 15 min puis lavés deux fois à l'eau pendant 1 min (Tableau 19). Les gels sont ensuite mis en présence du nitrate d'argent pendant 10 min et lavés à l'eau MilliQ deux fois pendant 1 min (Tableau 19). La coloration est révélée par ajout d'une solution de révélation (Tableau 19) pendant 5 à 10 min et stoppée par transvasement dans un bain d'EDTA (30 g d'EDTA pour 2 L d'eau). Les gels sont colorés deux par deux.

Tableau 22 : Quantités des réactifs intervenant dans la révélation à l'argent des gels

	Sensibilisation	Coloration		Révélation		
	Thiosulfate de sodium 20%	Nitrate d'argent	Formaldéhyde	Carbonate de potassium	Formaldéhyde	Thiosulfate de sodium 20%
400 mL (2 gels)	0,8 mL	4,8 µL	120 µL	12 g	120 µL	50 µL

Les gels sont, au final, lavés deux fois à l'eau MilliQ pendant 5 min avant d'être mis dans la solution de «preserving» contenant de l'éthanol et du glycérol (600 mL + 100 mL qsp 2 L avec de l'eau) pour une durée de 45 min. Ils sont ensuite séchés durant 24h à l'intérieur des cadres avant d'être scannés et analysés par le logiciel ImageMaster 2D v4®.

d/ Révélation à l'argent modifié (Shevchenko)

La fixation s'effectue pendant 1 h dans une solution contenant de l'éthanol et de l'acide acétique (600 mL et 100 mL dans 2 L) et est suivie par deux lavages à l'eau MilliQ de 10 min (Tableau 20). Les gels sont ensuite sensibilisés avec le thiosulfate de sodium à 15% pendant 2 min puis lavés deux fois à l'eau pendant 1 min (Tableau 20). Les gels sont ensuite mis en présence du nitrate d'argent pendant 20 min et lavés à l'eau pendant 1 min, deux fois. La coloration est révélée par ajout d'une solution de révélation (Tableau 20) pendant 5 min et stoppée par transvasement dans un bain d'acide acétique 5% (Schevchenko et al., 1996). Les gels sont colorés deux par deux :

Tableau 23 : Quantités des réactifs utilisés lors de la révélation à l'argent modifié (Schevchenko)

	Sensibilisation	Coloration		Révélation	
	Thiosulfate de sodium 20%	Nitrate d'argent	Formaldéhyde	Carbonate de sodium	Formaldéhyde
400 mL (2 gels)	0,533 mL	2,4 µL	432 µL	8 g	432 µL

Les gels sont, au final, lavés deux fois à l'eau pendant 1 min avant d'être mis dans la solution de stockage contenant de l'acide acétique 1%. Les gels sont conservés à 4°C en chambre froide avant le prélèvement des spots.

Cette méthode est compatible avec la spectrométrie de masse car on diminue la quantité des réactifs et surtout la quantité en formaldéhyde. Ce dernier est un agent de «cross linking» qui permet une plus grande sensibilité de la coloration. Sa faible présence a pour conséquence une coloration qui reste en surface ainsi la spectrométrie de masse (MS) pourra être réalisée sur la partie non colorée du spot.

e/ Identification des protéines en spectrométrie de masse

Les analyses d'identification des protéines par spectrométrie de masse ont été effectuées par Jean-Marc Strub et Alain Van Dorsselaer (CNRS, Strasbourg).

- **Découpe et traitement des morceaux de gel par le robot MassPrep**

Les spots contenant les protéines sont prélevés grâce à un cône de pipette. Le robot de préparation MassPrep Station (Micromass Ltd.) est utilisé pour la décoloration, la réduction, l'alkylation et les lavages des morceaux de gels. Ces derniers sont décolorés par ajout de 50 µL de solution de potassium ferricyanure 15 mM/ sodium thiosulfate 50 mM puis lavés par 50 µL d'ACN (acétonitrile) suivi de 75 µL de NH_4HCO_3 25 mM. Les spots sont ensuite déshydratés par 50 µL d'ACN pendant 5 min à 60°C. L'étape de réduction s'effectue en présence de 50 µL de DTT 10 mM pendant 30 min à 60°C puis 30 min à température ambiante. Cette étape est suivie par une étape d'alkylation par ajout de 50 µL d'IAM 55 mM pendant 20 min. Avant de recevoir l'enzyme de digestion, les morceaux de gels sont lavés puis déshydratés en présence d'ACN.

- **Digestion enzymatique et extraction des peptides**

Les morceaux de gels sont soumis à la digestion par l'endopeptidase trypsine (Promega V5111) en solution dans du NH_4HCO_3 25 mM pH 7 afin d'obtenir une concentration à 12,5 ng/µL. La digestion se déroule pendant 12h à 37°C. L'extraction des peptides de digestion se fait par l'ajout d'une solution H_2O/ACN (40/60 v/v) acidifié par 0,1% d'acide formique (HCOOH). Après 30 min sous agitation, le surnageant est prélevé et réduit à 7µL par évaporation avant l'analyse en LC-MS/MS.

- **Identification protéique par nanoAcquity UPLC SYNAPT MS**

L'analyse est effectuée grâce à l'utilisation d'une nanoAcquity Ultra Performance Liquid Chromatography (Waters) couplée à un spectromètre de masse de type SYNAPT (Waters) (Figure 74). Le système opère en mode positif et les résultats sont étudiés avec le logiciel ProteinLynx Global Server (version 2.3, Waters) puis les données sont analysées grâce à MASCOT (www.matrixscience.com). En MS/MS, la fragmentation s'effectue par collision avec l'argon.

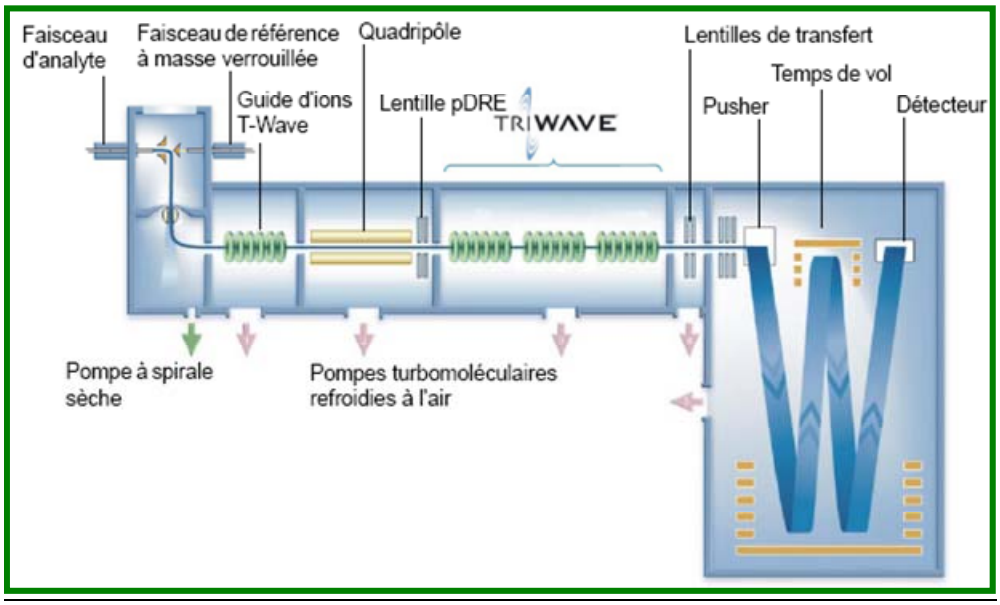


Figure 74 : Schéma du spectromètre de masse de type SYNAPT (Waters)

Les éluants utilisés sont de l'eau MilliQ : acide formique 0,1% (solvant A) et de l'ACN : acide formique 0,1% (solvant B). Le piégeage des peptides se déroule pendant 3 min avec 99% du solvant A et 1% du solvant B puis un gradient de 1 à 40% de solvant B pendant 35 min suivi par 5 min à 65% permet l'élution des peptides.

- **Identification protéique par un couplage nanoLC-ChipCube–Trappe ionique (HCT plus ou HCT Ultra)**

Les analyses sont réalisées à l'aide d'une chaîne HPLC 1100 équipée d'un système nanoLC-ChipCube (Agilent Technologies) couplé à une trappe ionique HCT plus ou HCT Ultra (Bruker Daltonics) (Figure 75). Le système opère en mode électrospray positif et le traitement des données est réalisé par le logiciel DataAnalysis 3.3 Build 146 (Bruker Daltonics) puis les recherches dans les banques de données sont faites via MASCOT.

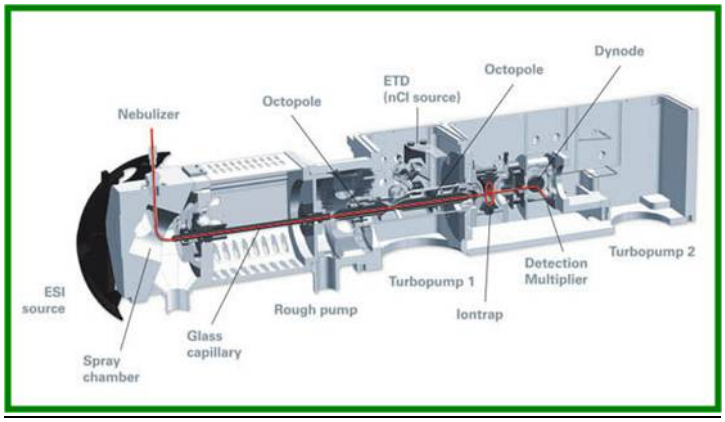


Figure 75 : Schéma du spectromètre de masse de type trappe ionique HCT plus ou HCT Ultra (Bruker Daltonics)

Les solvants utilisés sont l'eau : ACN 2% : acide formique 0,1% (solvant A) et l'ACN : H_2O 2% : acide formique 0,1% (solvant B). La séparation des peptides est réalisée à un débit de 300 nL/min sur deux types de colonnes avec un gradient linéaire de 8% à 40% de solvant B en 7 min pour la colonne de 43 mm et un gradient linéaire 8% à 40% en 30 min pour la colonne de 150 mm.

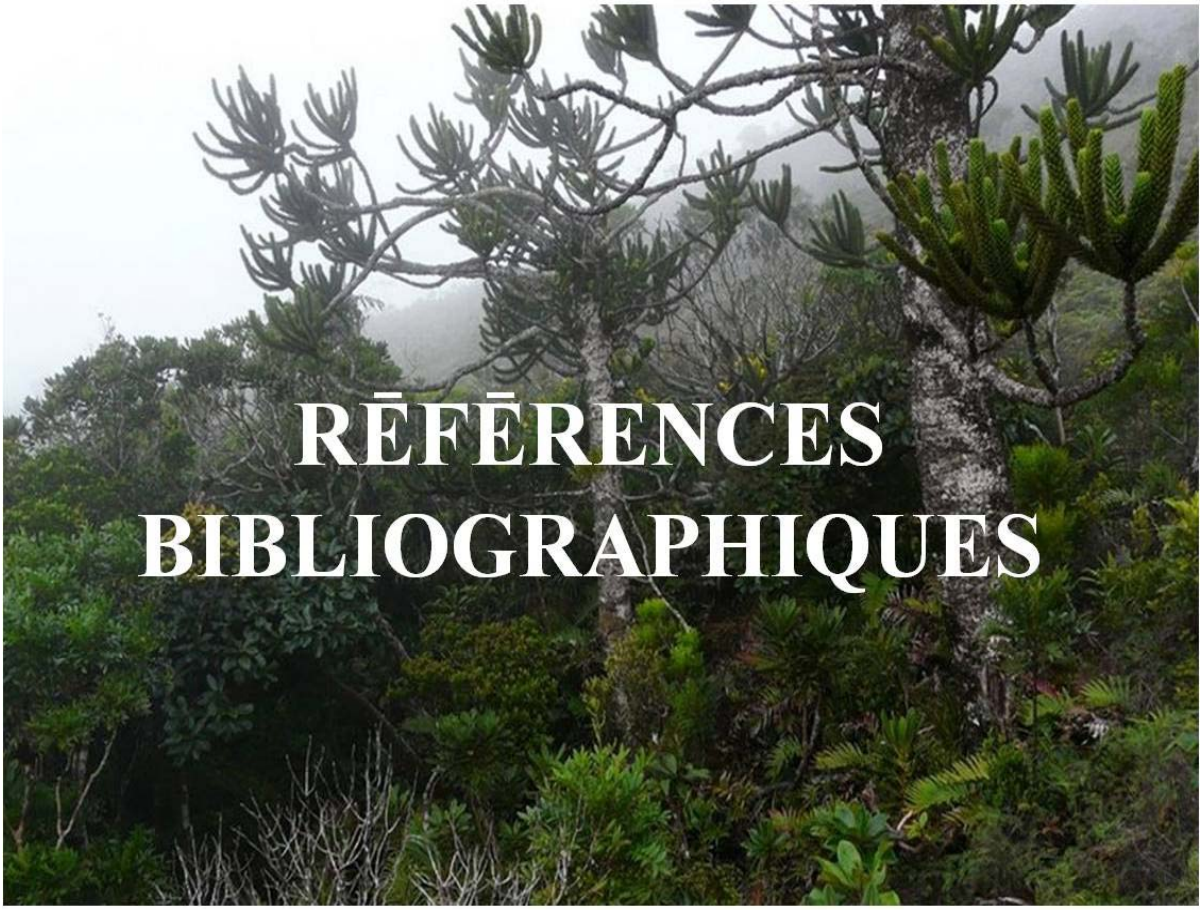
- **Construction de la base de données des protéines de *P. douarrei***

Une fois les protéines mises en évidence par spectrométrie de masse, une panoplie d'outils nous permet de mieux situer leurs rôles dans la physiologie de la graine. Ainsi, en plus des outils classiques de protéomique renseignant sur les modifications post-traductionnelles des protéines ou leur adressage subcellulaire, afin de mieux apprécier les rôles physiologiques joués par les protéines identifiés au sein de la graine de *P. douarrei,* plusieurs logiciels et bases de données ont été consultés :

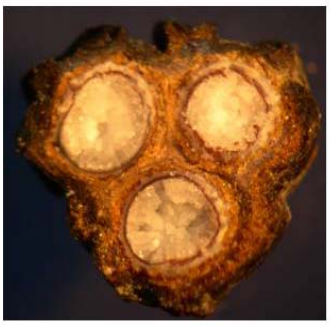
Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) permet de mieux caractériser les protéines initialement répertoriées dans les catégories des protéines non connues ou non classées.

PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed) donne la liste des publications relatives à ces protéines.
MetaCyc (http://metacyc.org) renseigne sur la participation des protéines dans des voies métaboliques spécifiques et tient compte en particulier du métabolisme des plantes.

L'ensemble de ces analyses a permis d'assigner une fonction aux protéines caractérisées. Les catégories fonctionnelles sont celles définies dans la classification de Bevan et al. (1998).



RĒFĒRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abugoch, L.E., Martínez, E.N., Añón, M.C., 2003. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. J. Agric. Food Chem. 51, 4060-4065.

A.G.I, 2000. Base de données de protéomique basée sur le génome de *Arabidopsis thaliana.*

Aissa, D., 1981. Etude expérimentale de la germination du chêne vert (*Quercus ilex* L.). Thèse de 3ème cycle, Aix-Marseille III, France, 72 pp.

Aitzetmuller, K., 2004. Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*) seed oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 81, 721-723.

Amen, R.D., Bonde, E.K., 1964. Dormancy and Germination in Alpine *Carex* from the Colorado Front Range. Ecology. 4, 881-884.

Amir, H., Pineau, R., 1998. Influence of plants and cropping on microbiological characteristics of some New Caledonian ultramafic soils. Aust. J. Soil Res. 36, 457-471.

Angelovici., R., Galili, G., Fernie, A.R., Fait, A., 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. Trends Plant Sci. 15, 211-218.

Auld, T.D., Denham, A.J., 1999. The role of ants and mammals in dispersal and post-dispersal seed predation of the shrubs *Grevillea* (Proteaceae). Plant Ecol. 144, 201-213.

Bacon, C.W., 1993. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. Agric. Ecosyst. Environ. 44, 123–141.

Baginsky., S., Gruissem, W., 2004. Chloroplast proteomics: potentials and challenges. J. Exp. Bot. 55, 1213-1220.

Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14, 93-107.

Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders — strategies in the response of plants to heavy metals. J. Plant Nutr. 3, 643-654.

Baker, K.S., Steadman, K.J., Plummer, J.A., Dixon, K.W., 2005. Seed dormancy and germination responses of nine Australian fire ephemerals. Plant Soil 277, 345-358.

Barcelo, J., Poschenrieder, C., 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. J. Plant Nutr. 13, 1-37.

Barclay, A.S., Earle, F.R., 1974. Chemical Analyses of Seeds III. Oil and Protein Content of 1253 Species. Econ. Bot. 28, 178-236.

Barnabas, A.D., Arnott, H.J., 1990. Calcium oxalate crystal formation in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coat. Botanical Gazette 151, 331-341.

Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1998. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego. Xiv + 666 pages

Baskin, J.M., Baskin, C.C., 1971. Germination of *Cyperus inflexus* Muhl. Botanical Gazette 132 (1), 3-9.

Baskin, J.M., Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. Seed Sci. Res. 14, 1-16.

Baskin, J.M., Baskin, C.C., Li, X., 2000. Taxonomy, anatomy, and evolution of physical dormancy in seeds. Plant Spec. Biol. 15, 139-152.

Becquer, T., Rigault, F., Jaffré T., 2002. Nickel bioavailability assessed by ion exchange resin in the field. Comm. soil. Sci. Plant. Anal., 33 (3- 4): 439-450.

Bell, D.T., Vlahos, S., Watson, L.E., 1987. Stimulation of seed germination of understorey species of the northern jarrah forest of Western Australia. Aust. J. Bot. 35, 593-599.

Berna, A., Bernier, F., Scott, K., Stuhlmuller, B., 2002. Ring up the curtain on DING proteins. FEBS Lett. 524, 6–10.

Berna, A., Scott, K., Chabriere, E., Bernier, F., The DING family of proteins: ubiquitous in eukaryotes, but where are the genes? Bioessays 31, 570–580.

Bertoli, C., Fay, L.B., Stancanelli, M., Gumy, D., Lambelet, P., 1998. Characterization of Chilean hazelnut (*Gevuina avellana* Mol.) seed oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 75, 1037-1040.

Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., Bergkamp, R., Dirkse, W.,Van Staveren, M., Stiekema, W., Drost, L., Ridley, P., Hudson, S.A., Patel, K., Murphy, G., Piffanelli, P., Wedler, H., Wedler, E., Wambutt, R., Weitzenegger, T., Pohl, T.M., Terryn, N., Gielen, J., Villarroel, R., De Clerck, R., Van Montagu, M., Lecharny, A., Auborg, S., Gy, I., Kreis, M., Lao, N., Kavanagh, T., Hempel, S., Kotter, P., Entian, K.D., Rieger, M., Schaeffer, M., Funk, B., Mueller-Auer, S., Silvey, M., James, R., Montfort, A., Pons, A., Puigdomenech, P., Douka, A., Voukelatou, E., Milioni, D., Hatzopoulos, P., Piravandi, E., Obermaier, B., Hilbert, H., Düsterhöft, A., Moores, T., Jones, J.D., Eneva, T., Palme, K., Benes, V., Rechman, S., Ansorge, W., Cooke, R., Berger, C., Delseny, M., Voet, M., Volckaert, G., Mewes, H.W., Klosterman, S., Schueller, C., Chalwatzis, N., 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. Nature 391, 485-488.

Bewley, J.D., 1997. Seed germination and plant dormancy. Plant Cell. 9, 1055-1066.

Bewley, J., Black, M., 1994. Seeds : Psysiology of development and germination, New York : Plenum Press.

Bhatia, N.P., Orlic, I., Siegele, R., Ashwath, N., Baker, A.J.M., Walsh, K.B., 2003. Elemental mapping using PIXE shows the main pathway of nickel movement is principally symplastic within the fruit of the hyperaccumulator *Stackhousia tryonii*. New Phytol. 160, 479–488.

Bhatia, N.P., Walsh, K.B., Baker, A.J.M., 2005. Detection and quantification of ligands involved in nickel detoxification in a herbaceous Ni hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. J. Exp. Bot. 56, 1343-1349.

Bidwell, S.D., Crawford, S.A., Woodrow, I.E., Sommer-Knudsen, J., Marshall, A.T., 2004. Sub-cellular localization of Ni in the hyperaccumulator, *Hybanthus floribundus* (Lindley) F. Muell. Plant Cell Environ. 27: 705-716.

Bidwell, S.D., Woodrow, I.E., Batianoff, G.N., Sommer-Knudsen, J., 2002. Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwillii* (Myrtaceae) from Queensland, Australia. Funct. Plant Biol. 29, 899-905.

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., Postel, W., 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. J. Biochem. Biophys. Methods 6, 317-339.

Black, M., Bewley, J.D., Halmer, P., 2006. The encyclopedia of seeds: science, technology and uses, CABI Publishing, Wallingford, UK.

Bocchieri, E., Floris, G., Mulas, B., 1987. Dormance, germination et contenu protéique des semences de deux populations *de Schoenus nigricans* cueillies à des altitudes différentes. Can. J. Bot. 65, 617-621.

Bocquet, A., Chambrey, C., Derroire, G., Tassin, J., 2007. Modes de colonization de la savanne arborée par des plantes de forêt tropicale sèche en Nouvelle-Calédonie. Rev. Ecol. (Terre vie) 62, 87-91.

Bombarda, I., Zongo, C., McGill, C.R., Doumenq, P., Fogliani, B., 2010. Fatty acids composition of the seeds of *Alphitonia neocaledonica* and *Grevillea exul var. rubiginosa*, occurrence of an ω5-monoene fatty acid series. J. Am. Oil Chem. Soc. *In press.* (DOI: 10.1007/s11746-010-1581-2)

Bourdon, E., Becquer, T., Edighoffer, S., Bonzon, B., 1997. Caractérisation du comportement physique de deux types de faciès de sol ferallitiques issus de roches ultramafiques. *In* : Jaffré, T., Reeves, R.D., Becquer, T. (eds) Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères, ORSTOM, Noumea, 49-56.

Boyd, R.S ., Martens, S.N., 1992. The raison d'etre for metal hyperaccumulation by plants. Pp 279–289 *In :* Baker, A.J.M, Proctor, J., Reeves, R.D. (eds) The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. Proceedings of the First International Conference on Serpentines Ecology, California, 19-22 juin 1991. Intercept, Andover, Angleterre.

Broadhurst, C.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Maugel, T.K., Erbe, E.F., Murphy, C.A., 2004. Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. Environ. Sci. Technol. 38, 5797-5802.

Brooks, R.R., 1987. The serpentine factor. Serpentine and its vegetation a multidisciplinary approach, 32-59.

Brooks, R.R., 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals : their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining. CAB International. The University Press, Cambridge, UK. 357 pp.

Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J., Robinson, B.H., 1998. Phytomining. Trends Plant Sci. 3, 359-362.

Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., Jaffré, T., 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. J. Geochem. Exp. 7, 49-57.

Brown, P.H., Welch, R.M., Cary, E.E., 1987. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. Plant Physiol. 84, 801-803.

Browning, J., Gordon-Grav, K.D., Smith, S.G., 1997. Achene Morphology and Pericarp Anatomy of the Type Specimens of the Australian and New Zealand Species of *Bolboschoenus* (Cyperaceae). Aust. Syst. Bot. 10, 49-58.

Briggs , C.L., Morris, E.C., 2008. Seed-coat dormancy in *Grevillea linearifolia* : Little change in permeability to an apoplastic tracer after treatment with smoke and heat. Ann. Bot. 101, 623-632.

Briggs, C.L., Morris, E.C., Ashford, A.E., 2005. Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia, G. buxifolia* and *G. sericea*: anatomy and histochemistry of the seed coat. Ann. Bot. 96, 965-980.

Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D., Wedd, A.G., 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. J. Biol. Inorg. Chem. 11, 2-12.

Carmi, N., Zhang, G., Petreikov, M., Gao, Z., Eyal, Y., Granot, D., Schaffer, A.A., 2003. Cloning and functional expression of alkaline alpha-galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. Plant J. 33, 97-106.

Carpenter, R.J., Read, J., Jaffré, T., 2003. Reproductive traits of tropical rain-forest trees in New Caledonia. J. Trop. Ecol. 19, 351-365.

Cataldo, D., Garland, T., Wildung, R., 1978. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. Plant Physiol. 62, 563-565.

Catusse, J., 2007. Utilisation de la protéomique pour la dissection des processus de germination et de vigueur germinative des graines de betterave à sucre. Thèse de Doctorat es science. Thèse de l'université de Pau et des Pays del'Adour, France.

Catusse, J., Strub, J.M., Job, C., Van Dorsseleaer, A., Job, D., 2008. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. P. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 10262-10267.

Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquie, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J., Rabilloud, T., 1998. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis 19, 1901-1909.

Christie, W.W., 1997. Structural analysis of fatty acids. In: Christie WW (ed) Advances in Lipid Methodology - Four, Oily Press, Dundee, pp. 119-169.

Coelho, C.P., Barbosa, A.A.A., 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. Acta Bot. Bras. 18, 481-489.

Coleman, R.G., Jove, C., 1992. Geological origin of serpentinites. *In* : Baker A.J.M., Proctor J., Reeves R.D. (eds). The vegetation of ultramafic (serpentine) soils. Proceedings of the First International Conference on Serpentines Ecology, California, 19-22 juin 1991. Intercept, Andover, Angleterre. 1-17.

Côme, D., 1982. Germination, in: Mazliak, P. (ed.), Physiologie végétale II. Croissance et développement. Hermann, Paris, pp. 129-225.

Côme, D., Corbineau, F., 2000. Storage of seeds. pp. 755-770. *In :* Artes F., Gill, M.I., Conesa, M.A. (eds). Improving Postharvest Technologies of Fruits, Vegetables and Ornamentals.

Côme, D., Corbineau, F., 2006. Dictionnaire de la biologie des semences et des plantules, eds. Tec et Doc, France.

Connor, K., Schaefer, G., Donahoo, J., Devall, M., Gardiner, E., Hawkins, T., Wilson, D., Schiff, N., Hamel, P., Leininger, T., 2007. Development, fatty acid composition, and storage of drupes and seeds from the endangered pondberry (*Lindera melissifolia*). Biol. Conserv. 137, 489-496.

Corner, E.J.H., 1976. The seeds of Dicoyledons, Vol. 1 & 2. Cambridge University Press, Cambridge.

Cornuet, V., Nicaise, T., Oliva, J., Talon, M., 1987. Ecologie en Nouvelle-Calédonie. éd., C.T.R.D.P., Nouméa. 297 p

CTFT, 1978. Problèmes de conservation du milieu naturel posés par l'exploitation du nickel, et recherches entreprises en vue de reconstituer la couverture végétale dégradée par l'exploitation minière et fixer les déblais miniers en Nouvelle Calédonie. CTFT-Nouméa.

Dakora, F.D., Phillips, D.A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant Soil 245, 35-47.

de Laubenfels, D.J., 1996. Gondwanan conifers on the Pacific Rim. *In: The origin and evolution of Pacific Islands biotas, New Guinea to Eastern Polynesia: patterns and processes* (eds. Keast, A., Miller, S.E.), pp. 261-265. SPB Academic Publishing, Amsterdam.

Darbinian-Sarkissian, N., Darbinyan, A., Otte, J., Radhakrishnan, S., Sawaya, B.E., Arzumanyan, A., Chipitsyna, G., Popov, Y., Rappaport, J., Amini, S., Khalili, K., 2006. p27(SJ), a novel protein from St. John's wort, that suppresses expression of HIV-1 genome. Gene Ther. 13, 288-295.

Darbinian, N., Popov, Y., Khalili, K., Amini, S., 2008. Creation of a bi-directional protein transduction system for suppression of HIV-1 expression by p27SJ. Antivir. Res. 79, 136-141.

Diemer, H., Elias, M., Renault, F., Rochu, D., Contreras-Martel, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Chabriere, E., 2007. Tandem use of X-ray crystallography and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein. Protein 71, 1708-1720.

Dixon, K.W., Roche, S., Pate, J.S., 1995. The promotive effect of smoke derived from burnt native vegetation on seed germination of Western Australian plants. Oecologia 101, 185-192.

Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109, 710-732.

Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho Thd., Mundy J., Quatrano, R., Thomas, T., Sung, Z.R., 1989. Common amino-acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Mol. Biol. 12, 475-486.

Enright, N.J., Rigg, L., Jaffré, T., 2001. Environmental controls on species composition along a (maquis) shrubland to forest gradient on ultramafics at Mont Do, New Caledonia. South African Journal of Science 97, 573-580.

Eskew, D.L., Welch, R.M., Cary, E.E., 1983. Nickel: an essential micronutrient for plants. Science 222, 621-623.

Estournès, J.M., 2001. Le nickel. Collection découvertes calédoniennes, édition Planète Memo. Nouméa. 61 p.

Farago, M.E., Cole, M.M., 1988. Nickel in plants. Metal Ions in Biological Systems 28, 47–90.

Fenner, M., Thompson, K., 2005. The ecology of seeds. Cambridge university press. New York.

Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytol. 171, 501-523.

Fogliani, B., 2002. De la connaissance physiologique des Cunoniaceae endémiques de la Nouvelle-Calédonie à la recherche des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de leurs substances bioactives d'intérêt. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Nouvelle-Calédonie* soutenue publiquement le 20 novembre 2002, 320 pp.

Fogliani, B., Bouraïma-Madjèbi, S., Medevielle, V., Pineau, R., 2004. Methods to promote germination of two Cunoniaceae species, *Cunonia macrophylla* and *Geissois pruinosa*, from New Caledonia. Seed Sci. Technol. 32, 703-715.

Forbis, T.A., Floyd, S.K., De Queiroz, A., 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants : implications for the evolution of seed dormancy. Evolution 56, 2112-2125.

Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. Calcium oxalate in plants : formation and function. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 41-72.

Garcia-Agustin, P., Primo-millo, E., 1989. Ultrastructure and biochemical changes in cotyledon reserve tissues during germination of *Citrus* seeds. J. Exp. Bot. 40, 383-390.

Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant growth regulation 37, 263-285.

Gauthier, D., Jaffré, T., Prin, Y., 2000. Abundance of *Frankia* from *Gymnostoma spp.* in the rhizosphere of *Alphitonia neocaledonica*, a non-nodulated *Rhamnaceae* endemic to New Caledonia. Eur. J. Soil Biol. 36, 169-175.

Giavalisco, P., Nordhoff, E., Kreitler, T., Klöppel, K.D., Lehrach, H., Klose, J., Gobom, J. 2005. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Proteomics 5, 1902-1913.

Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions A, Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson,

R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A., Briggs, S., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). Science 296, 92-100.

Griffaut, B., Debiton, E., Madelmont, J.C., Maurizis, J.C., Ledoigt, G., 2007. Stressed Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) excrete a protein fraction with specific cytotoxicity on plant and animal tumour cell. Biochim. Biophys. Acta 1770, 1324–1330.

Griffiths, G., Leverentz, M., Silkowski, H., Gill, N., Sánchez-Serrano, J.J., 2000. Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. J. Exp. Bot. 51, 1363-1370.

Gupta, S.K., Chaudhry M.L., Das, S.N., 2000. Effect of Nickel and Nitrogen on seed yield, oil content and oil quality of Raya (*Brasica juncea* L.) in typic Ustochrept and typic Haplaquept of Haryana. J. Ind. Soc. Soil Sci. 50, 144-146.

Gupta, D.K., Tohoyama, H., Joho, M., Inouhe, M., 2002. Possible roles of phytochelatins and glutathione metabolism in cadmium tolerance in chickpea roots. J. Plant. Res. 115, 429-437.

Gutiérrez, R.A., Green, P.J., Keegstra, K., Ohlrogge, J.B., 2004. Phylogenetic profiling of the *Arabidopsis thaliana* proteome: what proteins distinguish plants from other organisms? Genome Biol. 5, R53.

Haines, L., Ennis, I.L., Blanchon, D.J., Triggs, C.M., 2007. Propagating the pale-flowered kumarahou (*Pomaderris hamiltonii*) and kumarahou (*Pomaderri kumeraho*) from seeds. New Zeal. J. Bot. 45, 91-100.

Hanley, M.E., Lamont B.B., 2000. Heat pre-treatment and the germination of soil-and canopy-stored seeds of south-western Australian species. Acta Oecol. 21, 315-321.

Hara, M., Fujinaga, M. Kuboi, T., 2005. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. J. Exp. Bot. 56, 2695-2703.

He, M., Yang, J., Cha, Y., 2000. Distribution, removal and chemical forms of heavy metals in polluted rice seed. Toxicol. Environ.Chem. 76, 137–145.

Hirano, H., Islam, N., Kawasaki, H., 2004. Technical aspects of functional proteomics in plants. Phytochemistry 65, 1487-1498.

Hocking, P.J., 1983. The dynamics of growth and nutrient accumulation by fruits of *Grevillea leucopteris* Meissn., a proteaceous shrub, with special reference to the composition of xylem and phloem sap. New Phytol. 93, 511-529.

Holdsworth, M., Finch-Savage, W.E., Grappin, P., Job, D. 2008. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. Trends Plant Sci. 13, 7-13.

Homer, F.A., Morrison, R.S., Brooks, R.R., Clemens, J., Reeves, R.D., 1991. Comparative studies of nickel, cobalt, and copper uptake by some nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*. Plant Soil 138, 195–205.

Ilarslan, H., Palmer, R.G., Horner, H.T., 2001. Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. Ann. Bot. 88, 243–257.

Ingle, R.A., Mugford, S.T., Rees, J.D., Campbell, M.M., Smith, A.C., 2005. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. Plant Cell 17, 2016–2089.

ISEE, 2010. Institut de la statistique et des études économiques. http://www.isee.nc/. (Page WEB consultée à la date du 1er Mars 2010).

ISTA, 1999. International rules for seed testing. Seed Sci. Technol. 27 (supplement).

Istambouli, A., 1976. Etude expérimentale sur la nature des périodes de repos des semences et des bougeons de l'olivier (*Olea europea* L.). Thèse de Doctorat es Science, Aix-Marseille. France.

Jaffré, T. 1976. Composition chimique et conditions d'alimentation minérale des plantes sur roches ultrabasiques (Nouvelle-Calédonie). Cahier de l'ORSTOM, Série Biologie 9, 53-63.

Jaffré, T., 1977. Accumulation du manganèse par des espèces associées aux terrains ultrabasiques de Nouvelle-Calédonie. Comptes Rend. l'Acad. Sci. - Série D Ecophysiologie 284, 1573-1575.

Jaffré, T., 1980. Végétation des roches ultramafiques en nouvelle-Calédonie. Travaux et Documents de l'ORSTOM, 124, 273 pp.

Jaffré T., 2004, IRD, Programme forêt sèche, URL : http://www.endemia.nc/biotopes/> (consultée d'avril à aout 2009).

Jaffré, T., Bouchet P., Veillon J.M., 1998. Threatened plants of New Caledonia : Is the system of protected areas adequate ? Biodivers. Conserv. 7, 107-135.

Jaffré, T., Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., 1976. *Sebertia acuminata*, a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. Science, 193, 579-580.

Jaffré, T., MacCoy, S.G., Rigault, F., Dagostini, G., 1997. Quelle méthode de végétalisation pour la réhabilitation des anciens sites miniers de Nouvelle-Calédonie ? *In* : Jaffré, T., Reeves, R., Becquer, T., (Eds). Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et des sols métallifères. ORSTOM, Nouméa. 285-288.

Jaffré, T., Latham, M., 1976. Recherches sur les possibilités d'implantation végétale sur déblais miniers. Rapport de convention ORSTOM / SLN. 16 p.

Jaffré, T., Morat P., Veillon, J.M., 1994a. La flore : Caractéristiques et composition floristique des principales formations végétales. Bois et Forêts des tropiques 242, 7-30.

Jaffré, T., Morat, P., Veillon, J.M., Rigault, F., Dagostini, G., 2004. Composition and characterization of the native flora of New Caledonia. Documents Scientifiques et Techniques, volume spécial II 4, Institut de recherche pour le Développement, centre de Nouméa.

Jaffré, T., Morat, P., Veillon, J.M., MacKee, H.S., 1987. Changements dans la végétation de la Nouvelle-Calédonie au cours du Tertiaire : la végétation et la flore des roches ultrabasiques. Bull. Mus. Natn. Hist. Nat. 9 (4), 365-391.

Jaffré, T., Pelletier, B., 1992. Plantes de Nouvelle-Calédonie permettant de revégétaliser des sites miniers. Edition S.L.N., Nouméa.

Jaffré, T., Rigault, F., 1989. Recherches sur les possibilités d'implantation végétale sur déblais miniers. ORSTOM-SLN, Nouméa. (Sci. Vie, Bota. Convention, n° 3). 20 p.

Jaffré, T., Rigault F., 1991a. Recherches sur les possibilités d'implantation végétale sur sites miniers. ORSTOM-SLN, Nouméa. (Sci. Vie, Bota. Convention, n° 4). 43 p.

Jaffré T., Rigault F., 1991b. Recherches sur les possibilités d'implantation végétale sur sites miniers. ORSTOM-SLN, Nouméa. (Sci. Vie, Bota. Convention, n° 5). 77 p.

Jaffré T., Rigault F., Sarrailh J.M., 1993. Essais de revégétalisation par des espèces locales d'anciens sites miniers de la région de Thio. ORSTOM-CIRAD-Province Sud-SLN, Nouméa. (Sci. Vie, Bota. Convention, n°7). 31 p.

Jaffré T., Rigault F., Sarrailh J.M., 1994b. Végétalisation des anciens sites miniers. Dossier Nouvelle-Calédonie. Bois et Forêts des Tropiques, 242, 45-57.

Jaffré, T., Veillon, J.M., 1990. Etude floristique et structurale de deux forêts denses humides sur roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie. Bull. Mus. Natn. Hist. Nat. 12, 243-273.

Jaffré T., Veillon J.M., 1994. Les principales formations végétales autochtones en Nouvelle-Calédonie : caractéristiques, vulnérabilité, mesures de sauvegarde. Rapp. Sci. Tech. Sci. Vie, Rapports de synthèse n° 2. ORSTOM. Nouméa. 12 p.

Jàuregui-Zúñiga D, Reyes-Grajeda JP, Sepúlveda-Sánchez JD, Whitaker JR, Moreno A., 2003. Crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coats of Phaseolus vulgaris and leaves of *Vitis vinifera*. J. Plant Physiol. 160 (14), 239-245.

Job, C., Kersulec, M., Ravasio, L., Chareyre, C., Pépin, R., Job, D., 1997. The solubilization of the basic subunit of sugar beet globulin during priming and early germination. Seed Sci. Res. 7, 225-243.

Jost, C., 1996. Contraintes et enjeux environnementaux des territories français du Pacifique Sud. *In* : Géopacifique des espaces français, Nouvelle Calédonie, Polynésie française, Wallis et Futuna. Collection Université. Coédition Géopacifique/C.T.R.D.P., Nouméa. 21-34.

Katsube, T., Kurisaka, N., Ogawa, M., Maruyama, N., Ohtsuka, R., Utsumi, S., Takaiwa, F., 1999. Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice. Plant Physiol. 120, 1063–1073.

Kausik, S.B., 1939. Studies in the Proteaceae III. Embrylogy of *Grevillea Banksii* R. Br. Ann. Bot. 8, 815-824.

Kelly, K.M., Van Staden, J., Bell, W.E., 1992. Seed coat structure and dormancy. Plant Growth Regul. 11, 201-209.

Keogh, J.A., Bannister, P., 1992. A method for inducing rapid germination in seed of *Discaria toumatou* Raoul. New Zeal. J. Bot. 30, 113-116.

Keogh, J.A., Bannister, P., 1994. Seed structure and germination in *Discaria toumatou* (Rhamnaceae). Weed Res. 34, 481-490.

Kermode, A.R., 1997. Approachs to elucidate the basis of dessication-tolerance in seeds. Seed Sci. Res. 7, 75-95.

Kersten, W.J., Brooks, R.R., Reeves, R.D., Jaffré, T., 1980. Nature of nickel complexes in Psychotria douarrei and other nickel-accumulating plants. Phytochemistry 19, 1963-1965.

Kier, G., Kreft, H., Ming Lee, T., Jetz, W., Ibisch, P., Nowitki, C., Mutke, J., Barthlott, W., 2009. A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. P. Natl. Acad. Sci. USA 106 (23), 9322-9327.

Ko, I.W.P., Corlett, R.T., Xu, R.J., Sugar composition of wild fruits in Hong Kong, China. J. Trop. Ecol. 14, 381-387.

Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C., 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. Nature 379, 635-638.

Krupa, Z., Siedlecka, A., Skórzynska-Polit, E., Maksymiec, W., 2002. Heavy metal interactions with plant nutrients. *In* : Prasad M.N.V., Strzalka, K., Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kuwer academic publishers, Dordrecht, Boston, London. 287-301.

Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., Wieshammer, G., McGrath, S.P., 2001. Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. J. Exp. Bot. 52, 2291-2300.

Lagrange, A., Ducousso, M., Jourand, P., Majorel, C., Amir, H., 2009. New insights into the mycorrhizal behaviour of Cyperaceae. Role of arbuscular mycorrhizas in growth and adaptation of *Costularia comosa* in New Caledonian ultramafic soils. *In press.*

Lamont, B.B., Groom, P.K., 1998. Seed and seedling biology of the Woody-fruited Proteaceae. Aust. J. Bot. 46, 387-406.

Lange-Hesse, K., Dunemann, L., Schwedt, G., 1994. Properties and binding forms of cadmium and nickel in protein extracts from bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). Fresen. J. Anal. Chem. 349, 460–464.

Larcher, W. 1995. The utilization of mineral elements. *In*: Larcher W. ed. Physiological plant ecology, 3rd edn. Berlin: Springer, 167-213.

Latham, M., 1985. Altération et pédogenèse sur roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie. Études et Thèses ORSTOM, Paris 331 pp.

Leck, M.A., Schütz, W., 2005. Regeneration of Cyperaceae, with particular reference to seed ecology and seed banks. Perspect. Plant Ecol. 7, 95-133.

Lee, J., Brooks, R.R., Reeves, R.D., Boswell, C.R., Jaffré, T., 1977. Plant-soil relationships in a New Caledonian serpentine flora. Plant Soil 46, 675-680.

Leishman, M.R., Westoby, M., 1998. Seed size and shape are not related to persistence in soil in Australia in the same way as in Britain. Funct. Ecol. 12, 480-485.

Leishman, M.R., Wright, I.J., Moles, A.T., Westoby, M., 2000. The evolutionary ecology of seed size. *In*: Fenner, M., (ed), Seeds: The ecology of regeneration in plant communities. 2nd edition. CAB Internationnal, pp. 31-58.

Léon, V., 2005. Contribution à la caractérisation des stratégies mises en jeu par les plantes endémiques à la Nouvelle-Calédonie pour leur développement sur les sols nickelifères. Thèses de doctorat, Université de la Nouvelle-Calédonie, 383 pp.

Léon, V., Rabier, J., Notonier, R., Barthelémy, R., Moreau, X., Bouraïma-Madjèbi, S., Viano, J., Pineau, R., 2005. Effects of three nickel salts on germinating seeds of *Grevillea exul rubiginosa*, an endemic serpentine Proteaceae. Ann. Bot. 95, 609-618.

Leung, J., Giraudat, J., 1998. Abscissic acid signal transduction. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 199-222.

Lewis, A.P., Crowther, D., 2005. DING proteins are from Pseudomonas. FEMS Microbiol. Lett. 252, 215–222.

L'Huillier, L., 1994. Biodisponibilité du nickel dans les sols ferralitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie. Effets toxiques de Ni sur le développement et la physiologie du maïs. Thèse de 3ème cycle, Université de Montpellier II, Montpellier. 249 pp.

L'Huillier, L., 2007. Assessment of soil seed banks for rehabilitation of nickel mines in New Caledonia. *In* "Proceedings of the Seed Ecology II 2007 Conference, 9-13 September, Perth, Australia". Eds. S Turner, D Merritt, S Clarke, L Commander and K Dixon. pp 51. Kings Park and Botanic Garden, Perth, Australia.

L'Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A., 2010. Mine et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. IAC Editions, in press, Nouvelle-Calédonie.

Li, W.W., Quinn, G.B., Alexandrov, N.N., Bourne, P.E., Shindyalov, I.N., 2003. A comparative proteomics resource: proteins of *Arabidopsis thaliana*. Genome Biol. 4, R51.

Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci. Soc. Amer. J. 42, 421–428.

Lokesha, R., Hedge, S.G., Uma Shaanker, R., Ganeshaiah, K.N., 1992. Dispersal mode as a selective force in shaping the chemical composition of seeds. Am. Nat. 140, 520-525.

Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Luçon, S., Marion, F., Niel, J.F., Pelletier, B., 1997. Réhabilitation des sites miniers sur roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. *In* : Jaffré, T., Reeves, R.D., Becquer, T. (eds). Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères, ORSTOM, Nouméa. 297-303 pp.

MacFie, S.M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P.M., 1994. Effect of cadmium, cobalt, copper and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influence of the cell wall and pH. Arch. Environ. Con. Tox. 27, 454-458.

MacKay, A.C., McGill, C.R., Fountain, D.W., Southward, R.C., 2002. Seed dormancy and germination of a panel of New Zealand plants suitable for re-vegetation. New. Zeal. J. Bot. 40, 373-382.

Magyarosy, A., Laidlaw, R.D., Kilaas, R., Echer, C., Clark, D.S., Keasling, J.D., 2002. Nickel accumulation and nickel oxalate precipitation by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biot. 59, 382-388.

Manceau, A., Llorca, S., Calas, G., 1987. Crystal chemistry of cobalt and nickel in lithiophorite and asbolane from New Caledonia. Geochim. Cosmochim. Ac. 51, 105-113.

Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London 889 p

Marshall, D.L., Levin, D.A., Fowler, N.L., 1986. Plasticity of yield components in resonse to stress in *Sesbania macrocarpa* ans *Sesbania vesicaria* (Leguminosae). Am. Nat. 127, 508-521.

Martin, A.C., 1946. The comparative internal morphology of seeds. Am. Midl. Nat. 36, 513–660.

McIlveen, W.D., Negusanti, J.J., 1994. Nickel in the terrestrial environment. Sci. Total Env. 148, 109-138.

Mazliak, P., 1997. Le métabolisme des lipides : Dans les plantes. Masson, pp. 185-201.

McCoy, S., Jaffré, T., Rigault, F., Ash, J.E., 1999. Fire and succession in the ultramafic maquis of New Caledonia. J. Biogeogr. 26, 579-594.

McCoy, S.G., Ash, J., Jaffré, T., 1997. The effect of *Gymnostoma deplancheanum* (Casuarinaceae) litter on seedling establishment of New Caledonian ultramafic maquis species. *In* : Proceeding of the second Australian biology for revegetation workshop (Eds Bellairs S.M., J.M. Osborne). 127-135 pp.

McCoy S.G., Kurpisz, D., Newedou, S., 2002. Species selection for revegetation of the Goro Nickel Project area in New Caledonia. Proc. Brit. Colomb. Mine Reclamation Symp., 213-225 pp.

McGill, C.R., McIntosh, J.C., Outred, H.A., Fountain, D.W., 2002. Seed storage and seed storage reserves in Chatam Island forget-me-not (Myosotidium hortensia, Boraginaceae). New Zeal. J. Bot. 40, 337-346.

Membre, N., Bernier, F., Staiger, D., Berna, A., 2000. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. Planta 211, 345–354.

Mewes, H.W., Albermann, K., Bähr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S.G., Pfeiffer, F., Zollner, A., 1997. Overview of the yeast genome. Nature 387, 7-65.

Minguzzi, C., Vergnano, O., 1948. Atti della Societa Toscana di Scienze Naturali, Memorie Serie A 55, p.49.

Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., 2004. Hotspots revisited. Cemex, Mexico.

Moles, A.T., Hodson, D.W., Colin, J.W., 2000. Seed size and shape and persistence in the soil in the New Zealand flora. Oikos 89, 541-545.

Molina, M.A., Circosta, A., Añón, M.C., Petruccelli, S. 2007. Mature *Amaranthus hypochondriacus* seeds contain non-processed 11S precursors. Phytochem. doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.008 [Epub ahead of print]

Montargès-Pelletier, E., Chardot, V., Echevarria, G., Michot, L.J., Bauer, A., Morel, J.L., 2008. Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopic study. Phytochem. 69, 1695-1709.

Morales, R., Berna, A., Carpentier, P., Contreras-Martel, C., Renault, F., Nicodeme, M., Chesne-Seck, M.L., Bernier, F., Dupuy, J., Schaeffer, C., Diemer, H., Van-Dorsselaer, A., Fontecilla-Camps, J.C., Masson, P., Rochu, D., Chabriere, E., 2006. Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein. Structure 14, 601–609.

Morales, R., Berna, A., Carpentier, P., Contreras-Martel, C., Renault, F., Nicodeme, M., Chesne-Seck, M.L., Bernier, F., Dupuy, J., Schaeffer, C., Chabrière, E., 2007. Discovery and crystallographic structure of human apolipoprotein. Annal Pharma. Franc. 65, 98–107.

Morat, P., Veillon, J.M., MacKee, H.S., 1986. Affinités floristiques et considérations sur l'origine des maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie. Adansonia 2,133-182.

Morat, P., Jaffré, T., Veillon, J.M., 1999. Menaces sur les taxons rares et endémiques de la Nouvelle-Calédonie. Bulletin de la Société Botanique du centre-ouest 19, 129-144.

Morris, E.C., Tieu, A., Dixon, K., 2000. Seed coat dormancy in two species of Grevillea (Proteaceae). Ann. Bot. 86, 771-775.

Mukerjee, R., Deshmane, S.L., Darbinian, N., Czernik, M., Khalili, K., Amini, S., Sawaya, B.E., 2008. St John's Wort protein, $p27^{SJ}$, regulates the MCP-1 promoter. Mol. Immunol. 45, 4028-4035.

Myerscough, P.J., Whelan, R.J., Bradstock, R.A., 2001. Ecology of Proteaceae with special reference to the Sydney region. Cunninghamia 6, 951-1015.

Myers, N., 1988. Threatened biotas: "hot spots" in tropical forests. The Environmentalist 8, 187-208.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403, 853-858.

Nazif, N.M., 2002. Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. Fruits and their antimicrobial activity. Food Chem. 76, 77-81.

Newton, R.P., Brenton, A.G., Smith, C.J., Dudley, E., 2004. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. Phytochem. 65, 1449-1485.

Nielsen, F.H., Sandstead, H.H., 1974. Are nickel, vanadium, silicon, fluorine, and tin essential for man ? A review. Am. J. Clin. Nutr. 27, 515-520.

Nikolaeva, M.G., 1969. Physiology of deep dormancy in seeds. *In:* I. N. Konovalov [ed.]. (Translated from the Russian by Z. Shapiro.) U.S. Department of Commerce, Clearinghouse for Federal Scientific and Technical Information, Springfield, Virginia, USA.

Nikolaeva, P.G., 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. *In* A. A. Khan [ed.], The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination, 51-74. North-Holland, Amsterdam, The Netherlands.

Nikolaeva, M.G., 1999. Patterns of seed dormancy and germination as related to plant phylogeny and ecological and geographical conditions of their habitats. Russ. J. Plant Physiol. 46, 432–437.

O'Farrell, P.H., 1975. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.

Offord, C., Mckensy, M., Brien, J., Errington, G., Cuneo, P., 2003. Germination and *ex situ* storage of *Hakea dohertyi* (Proteaceae) seed. Cunninghamia. 8, 129-132.

Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Bekghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F., Bailly, C., 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. Plant J. 50, 452-465.

Özbingöl, N., Corbineau, F., Côme, D., 1998. Responses of tomato seeds to osmoconditioning as related to temperature and oxygen. Seed Sci. Res. 8, 377-384.

Özgül-Yücel, S., 2005. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. J. Am. Oil. Chem. Soc. 82, 893-897.

Padhye, M.MD., 1971. Studies in Cyperaceae. III. Life History of *Kyllinga brevifolia* Rottb. with a Brief Discussion on Systematic Position of Kyllinga. Botanical Gazette 132 (3), 172-179.

Pammenter, N.W., Adamson, J.H., Berjak, P., 1974. Viability of stored seed: extension by cathodic protection. Science 20, 1123-1124.

Pantazaki, A.A., Tsolkas, G.P., Kyriakidis, D.A., 2008. A DING phosphatase in *Thermus thermophilus*. Amino Acids 34, 437-448.

Pate, J.S., Rasins, E., Rullo, J., Kuo, J., 1986. Seed nutrient reserves of Proteaceae with special reference to protein bodies and their inclusions. Ann. Bot. 57, 747–770.

Pelletier, B., 1990. Techniques minières permettant de préserver l'environnement autour des gisements d nickel Néo-Calédonien. International Society for reef Studies. UFP Nouméa, 27-34.

Pelletier, B., 1982. Origine et nature des minerais de nickel de Nouvelle Calédonie, 2ème édition. SLN, Service Géologie, 21-47.

Pelletier, B., 2001. L'industrie minière et l'environnement, introduction aux travaux réalisés en Nouvelle-Calédonie. DEUST Géosciences, Université de la Nouvelle-Calédonie, Document interne, SLN/UNC, 1-23.

Pelletier, B., 2003. Les méthodes d'exploitation et de revégétalisation mises en place depuis les années 70 sur les mines de nickel de Nouvelle-Calédonie. Bulletin de l'Union Française des Géologues, Département Géologie-Sondages, Société Le Nickel, Nouméa 7 pp.

Pelletier, B., Esterle, M., 1995. Revegetation of nickel mines in New Caledonia. Colloquium : Quelle recherche française en environnement dans le Pacifique Sud ? Bilan et Perspectives, Paris, 9 pp.

Peralta, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J.G.,2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). B. Environ. Cont. Toxicol., 66, 727-734.

Perera, T., Berna, A., Scott, K., Lemaitre-Guillier, C., Bernier, F., 2008. Proteins related to St. John's Wort p27SJ, a suppressor of HIV-1 expression, are ubiquitous in plants. Phytochem. 69, 865-872.

Perrier, N., Colin, F., Jaffré, T., Ambrosi, J.P., Rose, J., Bottero, J.Y., 2004. Nickel speciation in *Sebertia acuminata*, a plant growing on a lateritic soil of New Caledonia. Comptes Rendus de Géoscience 336, 567-577.

Perrier, N., Amir, H., Colin, F., 2006. Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo massif, New Caledonia. Mycorrhiza 16, 449-458.

Persans, M.W., Salt, D.E., 2000. Possible molecular mechanisms involved in nicke, zinc and selenium hyperaccumulation in plants. Biotechnol. Gen. Engineering Rev. 17, 389-413.

Piatkowski, D., Bartels, D., 1990. Characterisation of five abscissic acid-responsive cDNA clones isolated from the dessication-tolerant plant Craterostigma plantagineum and their relationship to other water-stress genes. Plant Physiol. 94, 1682-1688.

Picard, M., 1999. L'archipel néo-calédonien : 300 millions d'années pour assembler les pièces d'un puzzle géologique. Centre de documentation pédagogique de Nouvelle-Calédonie, Impression Graphoprint, 102 pp.

Piesschaert, F., 2001. Carpology and Pollen Morphology of the Psychotrieae (Rubiaceae–Rubioideae), Towards a New Tribal and Generic Delimitation. Dissertation, Catholic University of Leuven. Belgium.

Plattner, R.D., Kleiman, R., 1977. *Grevillea robusta* seed oil: A source of ω-5 monoenes. Phytochemistry 16, 255-256.

Pouschat, P., 2009. Transfert du manganèse et du nickel depuis des sols latéritiques vers des plantes accumulatrices le long d'une toposéquence de massif minier de Nouvelle-Calédonie : Localisation, spéciation et mécanismes. Thèse de Doctorat es Science, Université Paul Cézanne. France.

Proctor, J., 2003. Vegetation and soil and plant chemistry on ultramafic rocks in the tropical Far East. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 6, 105-124.

Proctor, J., Nagy L.,1992. Ultramafic rocks and their vegetation: an overview. In: The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils: Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology 469-494pp.

Prychid, C.J., Rudall, P.J., 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. Ann. Bot. 84, 725-739.

Przybylowicz, W.J., Pineda, C.A., Prozesky, V.M., Mesjasz-Przybylowicz, J., 1995. Investigation of Ni hyperaccumulation by true elemental imaging. Nucl. Instrum. Meth. B 104, 176-181.

Psaras, G.K., Constantinidis, T., Cotsopoulos, B., Manetas, Y., 2000. Relative abundance of nickel in the leaf epidermis of eight hyperaccumulators: evidence that the metal is excluded from both guard cells and trichomes. Ann. Bot. 86, 73-78.

Psaras, G.K., Manetas, Y., 2001. Nickel localization in seeds of the hyperaccumulator Thlaspi pindicum Hausskn. Ann. Bot. 88, 513-516.

Qiu, Y.L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z., Savolainen, V., and Chase, M.W., 1999. The earliest angiosperms: Evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. Nature 402, 404–407.

Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., Job, D. 2004. The effect of α-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. Plant Physiol. 134, 1598-1613.

Rao, G.R., Korwar, G.R., Shanker, A.K., Ramakrishna, Y.S. 2008. Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. Trees-Struct.Funct. 22, 697-709.

Rauser, W.E., 1990. Phytochelatins. Ann. Rev. Biochem. 59, 61-86.

Razafimandimbison, S.G., Rydin, C., Bremer, B., 2008. Evolution and trends in the Psychotrieae alliance (Rubiaceae)-A rarely reported evolutionary change of many-seeded carpels from one-seeded carpels. Mol. Phylogenet. Evol. 48 (1), 207-223.

Reeves, R.D., 1992. *In*: The vegetation of ultramafic (Serpentine) soils, eds. A.J.M. Baker, J. Proctor and R.D. Reeves (Intercept, Andover, Hampshire, UK, 1992) ch. 20, 253 p.

Richter, L.V., Azzopardi, A., Johnstone, R., Offord, C., 2001. Seed germination in the rare shrub *Grevillea kennedyana* (Proteaceae). Cunnighamia 7, 205-212.

Rigault, F., Dagostini, G., Jaffré, T., 1996. Contribution à la mise au point de techniques d'ensemencement hydrauliques sur sites miniers : implantation d'espèces locales et relation avec les conditions climatiques. ORSTOM–SLN, Nouméa. Sci., Vie, Bota., Convention, n°8. 60 pp.

Roberts, C.M., McClean, C.J., Veron, J.E.N., Hawkins, J.P., Allen, G.R., McAllister, D.E., Mittermeier, C.G., Schueler, F.W., Spalding, M., Wells, F., Vynne, C., Werner, T.B., 2002. Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. Science 295, 1280-1284.

Robertson, A.I., 1992. The relation of nickel toxicity to certain physiological aspects of serpentine ecology: some facts and a new hypothesis. *In*: Baker A.J.M., Proctor, J., Reeves, R.D. (eds). The vegetation of ultramafic (serpentine) soils. Proceedings of the first international conference on serpentine ecology, California, 19-22 juin 1991. Intercept, Andover, Angleterre. 331-336.

Roche, S., Koch, J.M., Dixon, K.W., 1997. Smoke enhanced seed germination for mine rehabilitation in the southwest of Western Australia. Restor. Ecol. 5, 191-203.

Roe, J.H., 1955. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 212, 335-343.

Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L.) Link. Chemosphere 40, 855-859.

Saintpierre, D., 2001. Identification de souches originales d'actinomycètes isolées de sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Caractérisation chimique de quelques antibiotiques produits. Thèse soutenue le 7 juin 2001. Sciences des Agroressources. I.N.P.T. France. 211 p.

Saintpierre-Bonaccio, D., Zongo, C., McGill, C.R., Bouraïma-Madjèbi, S., Fogliani, B., 2007. Biology, structure, and germination characteristics of kùa seeds (*Alphitonia neocaledonica,* Rhamnaceae) used for re-vegetation in New Caledonia. *In* : Conference Proceedings "Seed ecology II, the 2nd International Society for Seed Science Meeting on Seeds and the Environment". Eds: Turner, S., Merritt, S., Clarke, L., Commander, L., Dixon, K. Perth, Western Autralia, 9-13 september, 77.

Santoni, V., Rabilloud, T., Doumas, P., Rouquie, D., Mansion, M., Kieffer, S., Garin, J., Rossignol, M., 1999. Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. Electrophoresis 20, 705-711.

Sarnighausen, E., Wurtz, V., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Reski, R., 2004. Mapping the *Physcomitrella patens* proteome. Phytochemistry 65, 1589-1607.

Sarrailh, J.M., 2002. La revégétalisation des exploitations minières: l'exemple de la Nouvelle-Calédonie. Bois et forêts des tropiques 272, 21-31.

Sarrailh, J.M., Ayrault, N., 2001. Revégétalisation des sites des anciennes mines de nickel en Nouvelle-Caledonie. (FAO) Unasylva 52, 16-20.

Schaumlöffel, D., Ouerdane, L., Bouyssiere, B., Lobinski, R., 2003. Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. J. Anal. Atom. Spectrom. 18, 120-127.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68, 850-858.

Shewry, P.R. 1995. Cereal seed storage proteins. *In:* Seed development and germination (Kigel J, Galili G, eds). New York: Marcel Dekker Inc., 45-72 pp.

Schmid, M., 2000. Fleurs et plantes de Nouvelle-Calédonie. Dans Caractères généraux de la flore néo-calédonienne. éds du pacifique. 9-17 pp.

Schütz, W., 2000. Ecology of seed dormancy and germination in sedges (*Carex*). Perspect. Plant ecol. 3(1), 67-89.

Scott, K., Wu, L., 2005. Functional properties of a recombinant bacterial DING protein: comparison with a homologous human protein. Biochim. Biophys. Acta 1744, 234–244.

Secrétariat de la CNUCED (Conférence des nations unies sur le commerce et le développement) 2006. http://www.unctad.org/infocomm/francais/nickel/plan.htm. (Page consultée le 1er Janvier 2010).

SER, 2004. The SER International Primer on ecological restoration, Version 2. Society for Ecological Restoration Sciences and Policy Working Group, [En ligne]. http://www.ser.org/content/ecological_restoration_primer.asp (Page consultée le 1er décembre 2009).

Service météorologique de la Nouvelle-Calédonie, METEO-France, 2010. http://climatheque.meteo.fr/okapi/accueil/okapiWeb/index.jsp.

Shewry, P.R., Casey, R., 1999. Seed proteins. *In* : Seed Proteins (Shewry, P.R., Casey, R., eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1-10.

Singh, B., Dang, Y.P., Mehta, S.C., 1990. Influence of nitrogen on the behavior of nickel in wheat. Plant soil 127, 213-218.

Smith, N.J.C., Zahid, D.M., Ashwath, N., Widmore D.J., 2008. Seed ecology and successional status of 27 tropical rainforest cabinet timber species from Queensland. Forest Ecol. Manag. 256, 1031-1038.

SOFA: The Seed Oil Fatty Acids Database of the Institute for Chemistry and Physics of Lipids (accessed Jan. 2009), Münster (Germany). http://www.bagkf.de/SOFA

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Nickrent, D.L., Johnson, L.A., Hahn, W.J., Hoot, S.B., Sweere, J.A., Kuzoff, R.K., Kron, K.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., Zimmer, E.A., Chaw, S.M., Gillepsie, L.J., Kress, W.J., Sytsma, K.J., 1997. Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. Ann. Miss. Bot. Gard. 84, 1-49.

Soltis, P.S., Soltis, D.E., Chase, M.W., 1999. Angiosperm phylogeny inferred irom multiple genes as a tool for comparative biology. Nature 402, 402-404.

Sporne, K.R., 1969. The ovule as an indicator of evolutionary status in angiosperms. New Phytol. 68, 555-566.

Stauber, E.J., Hippler, M., 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* proteomics. Plant Physiol. Biochem. 42, 989-1001.

Sundar, Rao, K., Sino, D., 1992. Fatty acid composition of 20 lesser-known Western Australian seed oils. J. Sci. Food Agr. 58, 585-587.

Svensson, J., Palva, E.T., Welin, B., 2000. Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. Protein Expres. Purif. 20, 169-178.

Thanos, C.A., Georghiou, K., Skarou, F., 1989. *Glaucium flavum* seed germination - an ecophysiological approach. Ann. Bot. 63, 121-130.

Tsevegsuren, N., Aitzetmuller, K., Vosmann, K., 2003. Isomers of hexadecenoic and hexadecadienoic acids in *Androsace septentrionalis* (Primulaceae) seed oil. Lipids 38, 1173-1178.

Tunnacliffe, A., Wise, M.J., 1994. The continuing conundrum of the LEA proteins. Naturwissenschaften 94, 791-812.

Turner, S.R., Merrit, D.J., Baskin, C.C., Dixon, K.W., Baskin, J.M., 2005. Physical dormancy in seeds of six genera of Australian *Rhamnaceae*. Seed Sci. Res. 15, 51-58.

Uren, N.C., 1992. Forms, reactions, and availability of nickel in soils. Adv. Agron. 48, 141-203.

Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marquès, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., Lebrun, M., Lobinski, R., 2003. Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. Anal. Chem. 75, 2740-2745.

Vasca, E., Materazzi, S., Caruso, T., Milano, O., Fontanella, C., Manfredi, C., 2002. Complex formation between phytic acid and divalent metal ions : a solution equilibria and solid state investigation. Anal. Bioanal. Chem. 374, 173-178.

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. New Phytol. 181, 759–776.

Vergnano Gambi, O., Gabbrielli, R., Pancaro, L., 1982. Nickel, chromium and cobalt in plants from Italian serpentine areas. Acta Oecol. 3, 291-306.

Vertucci, C.W., Roos, E.E., 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. Plant Physiol. 94, 1019-1023.

Vickery, J.R., 1971. The fatty acid composition of the seed oils of Proteaceae: a chemotaxonomic study. Phytochemistry 10, 123-130.

Vohra, P., Gray, G.A., Kratzer, F.H., 1965. Phytic acid-metal complex. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 120, 447-449.

Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphery-Smith, I., 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis 16, 1090-1094.

Welch, R.M., 1995. Micronutrient nutrition of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 14, 49-82.

Whittaker, R.H., 1954. The ecology of serpentine soils IV. The vegetational response to serpentine soil. Ecology 35, 275-288.

Wildgruber, R., Harder, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W., Fey, S.J., Larsen, P.M., Görg, A., 2000. Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of S*accharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. Electrophoresis 21, 2610-2616.

Witkowski, E.T.F., Weiersbye-Witkowski, I.M., Przybylowicz, W.J.,Mesjasz-Prysbylowicz, J., 1997. Nuclear micropobe studies of elemental distributions in dormant seeds of *Burkea africana*. Nucl. Instrum. Meth. B 130, 381–387.

Wulff, A., L'Huillier, L., Vea, C., Tassin, J., 2008. Caractéristiques germinatives de graines d'espèces indigènes candidates à la restauration des sites ultramafiques dégradés de Nouvelle-Calédonie. Ed. IAC, Rapport de convention SYSMIN 8e FED, 92 p.

Wulff, A., L'Huillier, L., Fogliani, B., Vea, C., 2009. Understanding germination characteristics of common species in order to conserve micro-endemic species in New Caledonia : the Hibbertia (Dilleniaceae) model. 19th Conference of the Society for Ecological Restoration International, 23-27 August, Perth, Western Australia, Australia.

Yang, Y.M., Zhang, J.Y., Huang, Z.H., 1989. Combined in-beam electron impact-B/E-linked scan mass spectrometry of oxazoline derivatives for the structure determination of long-chain insaturated fatty acids. J. Lipid Res. 30, 127-133.

Yoshinaga, A. Y., Walters, C., 2004. Conservation of Tropical Island Seeds : an example from Hawai'i. *In* : Seed Conservation : Turning Science Into Practice (Eds : Smith, R., Dickie, J., Linington, S., Pritchard, H., Probert, R.). Kew Publishing, 957-963 pp.

Younis, Y.M.H., Ghirmay, S., Al-Shihry, S.S., 2000. African *Cucurbita pepo* L.: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. Phytochemistry, 54, 71-75.

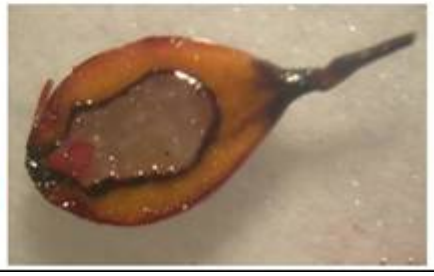
Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han,Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L.,Yuan, L., Yang, H., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa L. ssp.indica*). Science 296, 79-92.

Zhang, H., Sreenivasulu, N., Weschke, W., Stein, N., Rudd, S., Radchuk, V., Potokina, E., Scholz, U., Schweizer, P., Zierold, U., Langridge, P., Varshney, R.K., Wobus, U., Graner, A., 2004. Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. Plant J. 40, 276-290.

Zhang, X.X., Scott, K., Meffin, R., Rainey, P. B., 2007. Genetic characterization of *psp* encoding the DING protein in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. BMC Microbiol. **7**:114.

Zongo, C., Saintpierre-Bonaccio, D., McGill, C.R., Bouraïma-Madjèbi, S., Hnawia, E., Fogliani, B., 2007. Lipid contents and fatty acids composition of seed storage reserves of eight species used for re-vegetation in New Caledonia and their implication for long term conservation. *In* : Conference Proceedings "Seed ecology II, the 2nd International Society for Seed Science Meeting on Seeds and the Environment". Eds: Turner, S., Merritt, S., Clarke, L., Commander, L., Dixon, K. Perth, Western Autralia, 9-13 september, 104. (Poster)

ANNEXES



ANNEXE 1

Famille

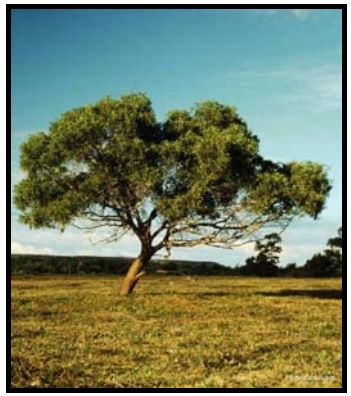
Légumineuses
Sous-famille : Mimosaceae

Généralités sur la famille

La sous-famille compte en Nouvelle-Calédonie 20 espèces, dont 15 sont endémiques. Elles sont réparties sur 7 genres. Le genre *Acacia* compte deux espèces autochtones : *A. spirorbis* et *A. simplex*.

Description de l'individu adulte

- Arbuste ou arbre parfois de grande taille (tronc: 0,80 m) ; rameaux nombreux; bois dur, imputrescible.



Pied adulte d'*Acacia spirorbis in situ*
(©B. Suprin)

- Description des feuilles

Feuilles en phyllodes falquées.

Feuillage d'*Acacia spirorbis*
(©G. Gateblé)

- Description des fleurs

Fleurs jaunes sur des inflorescences en épis, axillaires.

Fleurs d'*Acacia spirorbis*
(©C. Letocart)

- Description du fruit

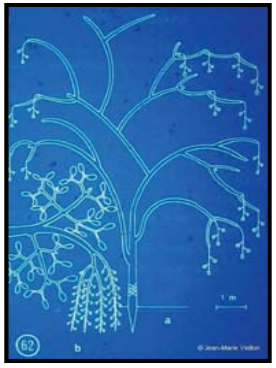
Fruits en gousses enroulées.

Fruits d'*Acacia spirorbis* (©JL. Ruiz)

Fruit décortiqué d'*Acacia spirorbis* (©C. Letocart)

Particularité biologique

L'architecture de cette espèce est conforme au Modèle de Troll :

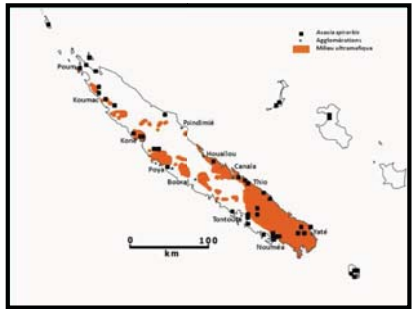


Habitat

L'espèce se développe en formations sclérophylles, en maquis dégradés ou en fourrés secondarisés, sur substrat ultramafique ou schisteux et sur calcaire madréporique.

Distribution géographique

Largement répandue sur l'ensemble du territoire.



Distribution géographique d'*Acacia spirorbis*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

La période de maturation des semences a lieu entre le mois d'octobre et le mois de décembre.

Extraction et conditionnement des graines

Les gousses sont mises à sécher au sec sous des néons ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 1,11 (± 0,06) g,
soit environ 90 (± 5) graines/g.

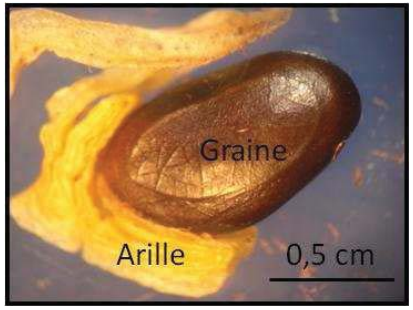
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante le taux de germination chute rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

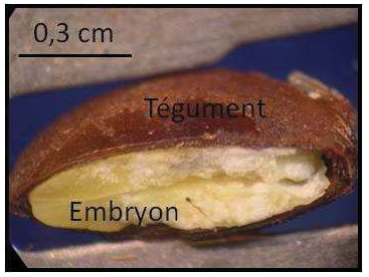
Les graines sont noires. Elles mesurent en moyenne 1,1 cm de long, 4 mm de large et 1,5 mm d'épaisseur. Elles possèdent par ailleurs une chevelure (arille) jaune.



Graines fertiles d'*Acacia spirorbis* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La dissection de la graine révèle la présence d'un embryon volumineux.



Coupe longitudinale de la graine d'*Acacia spirorbis* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé M13 :

- *Composition brute en protéines*

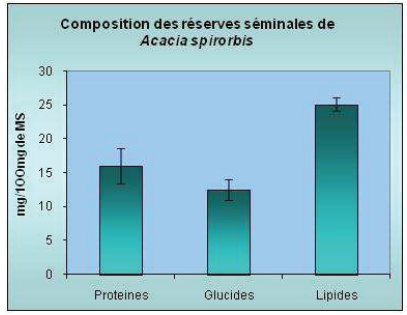
14,74 ± 2,42 mg/100mg de matière fraîche
15,97 ± 2,62 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

11,53 ± 1,42 mg/100mg de matière fraîche
12,50 ± 1,54 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

23,16 ± 0,90 mg/100mg de matière fraîche
25,10 ± 0,98 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides neutres :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids	(+/- SE)
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	14,35	0,421
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadecanoic	Palmitoleic	1,09	0,021
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	1,49	0,068
C 18:1Δ9	trans-9-Octadecanoic	Elaidic	0,02	0,005
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	26,65	0,910
C 18:1Δ11	cis-11-Octadecanoic	Vaccenic	2,06	0,072
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	47,22	2,068
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	0,21	0,024
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,48	0,023
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic		0,34	0,002
C 20:2Δ11,14	cis,cis-11,14-Eicosadienoic		0,11	0,006
C 20:4n6Δ5,8,11,14	all-5,8,11,14-Eicosatetraenoic	Arachidonic	0,09	0,008
C 22:0	Docosanoic	Behenic	2,31	0,046
C 24:1Δ15	cis-15-Tetracosenoic	Nervonic	0,09	0,022
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			96,51	3,765

Il est à noter qu'une faible quantité d'acides gras présents en trace n'a pu être identifiée. Ceux-ci sont en cours d'étude.

Degré d'humidité

- Graine en poudre:
  7,73 % (+/- 0,27).

Il s'agit d'une graine de type orthodoxe.

Acsmithia meridionalis

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces, **toutes endémiques**, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle Calédonie contre 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle Calédonie contre 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle Calédonie contre 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbuste de 2 à 3 mètres

- Description des feuilles

Feuilles unifoliolées coriaces, glabres, pétiolées, verticillées par 3, 4 ou 5, elliptiques à marge entière décurrente à la base sur une courte distance, 3 fois plus longues que larges, avec 6 à 8 nervures saillantes sur la face inférieure. Bourgeon terminal glabre à aspect résineux.

- Description de la fleur

Inflorescence glabre, en panicule de couleur jaune.

Vue d'un rameau avec inflorescences d'*Acsmithia meridionalis* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

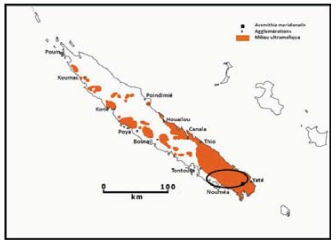
Infrutescence en panicule composée de fruits verts à l'état jeune et brun à maturité.

Infrutescence d'*Acsmithia meridionalis* (©LIVE/UNC)

Fruits glabres de couleur verte jeunes puis bruns à maturité s'ouvrant en trois fentes du bas vers le haut sur la quasi-totalité de la longueur.

Fruit mature d'*Acsmithia meridionalis* (©LIVE/UNC)

Distribution géographique



Distribution géographique d'*Acsmithia meridionalis* selon Hoogland (1987) ○ et lieu de collecte des graines étudiées ▪.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

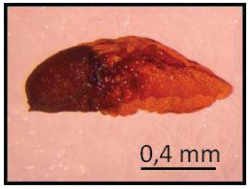
Poids de 1000 graines : 1,25 (± 0,001) mg, soit 800000 (± 1000) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

Description de la semence

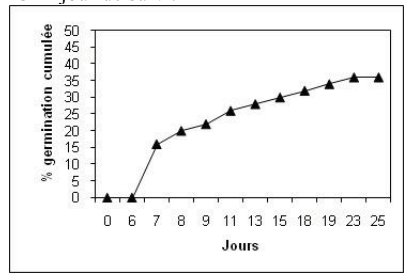
1/ Structure externe :
La semence présente une forme grossièrement ovaloide, sa taille variant de 1,2-1,3 x 0,3-0,4 mm. La graine présente une partie ailée plate (rôle dans la dissémination par le vent) de couleur marron clair et une partie de forme ovale bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers de couleur marron plus foncé occupant moins de la moitié de la surface de la graine.



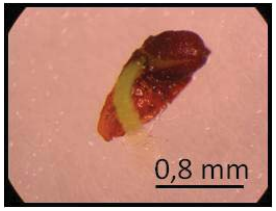
Graine d'*A. meridionalis* (©LIVE/UNC)

Germination

Du fait d'une faible quantité de graines, seule une expérience de germination a pu être menée à 25°C à la lumière conduisant à un taux de germination proche de 40%. Celle-ci a lieu dès le 7ème jour et se poursuit jusqu'au 23ème jour de suivi.



Graphique représentant la germination en fonction du temps des graines de *A. meridionalis* à 25°C à la lumière (▲).



Graine germée d'*A. meridionalis* (©LIVE/UNC)

Il est intéressant de noter que la zone de sortie de la radicule est située dans la partie médiane comme pour les espèces du genre *Pancheria* mais à l'inverse de celles du genre *Geissois* et *Cunonia*.

Stade cotylédonaire

Remarque : Aucune autre étude spécifique n'a été à ce jour menée sur cette espèce faute de quantité suffisante.

Alphitonia neocaledonica

Famille

Rhamnaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 10 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 7 endémiques, réparties sur 6 genres. Le genre *Alphitonia* compte 3 espèces toutes endémiques à la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbre mince et élancé de 1 à 3 mètres, écorce blanche marbrée assez lisse, cime ronde, branches minces.

- Description des feuilles
  Feuilles alternes d'environ 10 cm de long, pétiole d'environ 1 à 3 cm.
  Le dessus des feuilles présente une coloration vert foncé, le revers est blanc et roux, pubescent. Les rameaux sont veloutés gris plomb, jeunes pousses fauves.

- Description de la fleur
  Les fleurs se présentent sous la forme de petites grappes de couleur fauve et sont disposées à l'aisselle des feuilles terminales.
  Elle se compose de 5 pétales en étoile, d'apparence plutôt charnue, de 4 mm de diamètre. Ces derniers sont veloutés à l'extérieur et lisse, blanc verdâtre à l'intérieur. Ovaire infère à 2 stigmates.

- Description du fruit
  Infrutescences en panicules. Les fruits, nombreux, renferment deux graines grossièrement hémisphériques assez grosses, la pulpe est fibreuse et orangée.
  Le fruit, de diamètre variant de 1,5 à 2,3 cm, est vert puis noir à maturité et d'aspect craquelé à pulpe orangée. Il se fend alors et se dégrade à terre, laissant accrochées à l'arbre 2 graines.

- Particularités

  Cette plante est caractérisée par la forte odeur camphrée de l'écorce et le revers des feuilles roux ou blanc.

Vue d'une inflorescence d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

Vue d'un fruit mur d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

Habitat

Elle se développe aussi bien en bordure de forêts denses humides, en forêts sclérophylles (sèches), qu'en maquis miniers ou zones secondaires dégradées. Elle s'installe préférentiellement sur des terrains ferralitiques ou sur des substrats de nature sédimentaire très bien alimentés en eau.

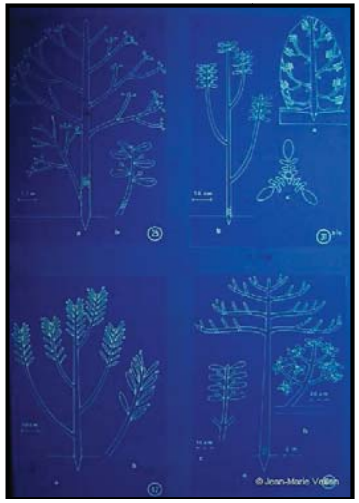
Distribution géographique

Largement répandue au sud de la Grande Terre, depuis 50 mètres et jusqu'à 1000 mètres d'altitude. Présente dans le nord mais totalement absente des Loyautés.

Distribution géographique d'*Alphitonia neocaledonica*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle d'Attims, ce qui signifie que les axes primaires et secondaires présentent une croissance monopodiale indéfinie.



Phénologie

- Fructification principalement de novembre à janvier, sur des plants d'au moins 0,5 m.

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

- De décembre à janvier (Jaffré et Rigault, 1991)
- Récolte des fruits noirs à pulpe sèche (fruit à aspect craquelé)

Fruits matures d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

Technique et conseil de récolte

- Au sécateur
- Par grappe entière

Extraction et conditionnement des graines

Actuellement, il semble que la meilleure technique d'extraction des graines soit de laisser sécher les fruits sous une lampe ou au soleil. Le fruit se craquelle, le péricarpe se fragilise et libère les graines. Si les fruits restent fermés, les faire tremper une nuit dans l'eau puis les faire sécher. L'opération peut être renouvelée plusieurs fois mais peut avoir une incidence sur la germination.
On peut ensuite les trier manuellement car la graine reste attachée au pédoncule, puis elles sont ensuite frottées à l'aide d'un tamis afin de les libérer de leur arille rouge.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 2,32 (± 0,1) g,
soit 41 (± 2) graines/g.

Techniques de conservation

- A température ambiante et au sec pendant plusieurs mois
- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

Description de la semence

1/ Structure du fruit :

Dans un fruit se retrouvent deux graines, chacune dans une loge carpellaire dont la fente de déhiscence est longitudinale et sur un seul côté.

Fruit, loge carpellaire et graine d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

2/ Structure externe :

La taille des semences est de 0,5-0,6 x 0,2-0,3 cm pour 1,5 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ovale aplatie, avec une extrémité plus rectiligne que l'autre (coté de la graine où la radicule perce).
Elle présente un arille de couleur rouge, facilement effrité à la main, qui découvre une graine de couleur noire avec un aspect très lisse et luisant.

Face dorsale d'une graine avec son arille d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

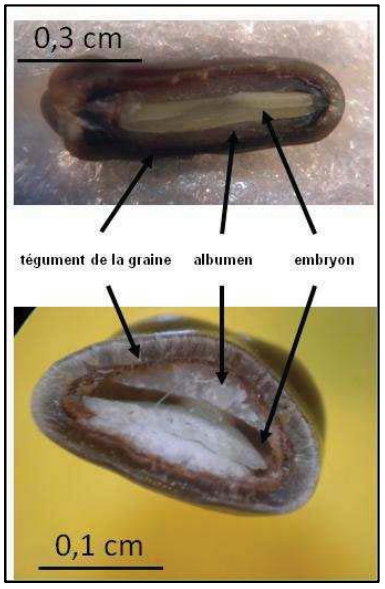
Face ventrale d'une graine avec son arille d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

Graine avec ou sans son arille d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

Face dorsale d'une graine sans son arille d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine de type albuminée (observation d'un embryon opaque placé au milieu du tissu nourricier).



Coupe longitudinale (en haut) et transversale (en bas) d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

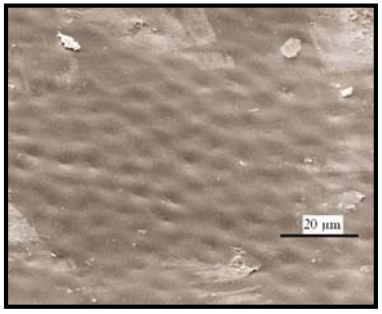
La dissection met en évidence une couche tégumentaire épaisse, cette dernière étant un inhibiteur mécanique de la germination de la graine.

L'embryon est axile, c'est-à-dire que celui-ci est placé dans l'axe de la graine, la radicule étant dirigée vers la base de la graine. Celle-ci est caractérisée par les restes visibles du point d'attache du fruit au niveau du fruit.

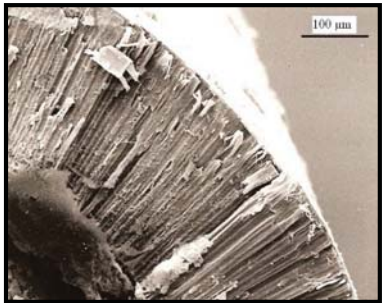
4/ Ultrastructure

- *Microscopie électronique de surface*

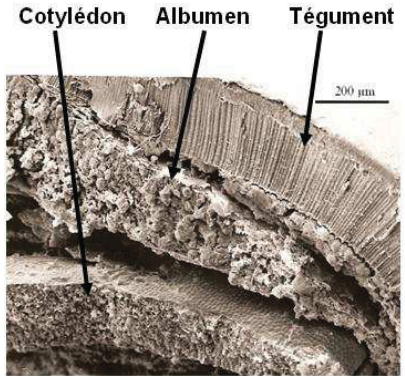
L'observation du tégument révèle en surface une imperméabilité évidente à l'eau :



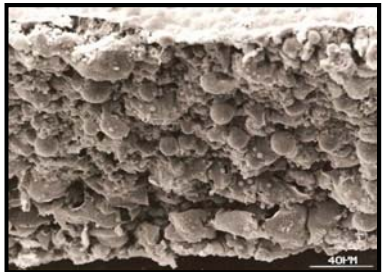
Sa coupe transversale montre une forte lignification caractéristique d'une dureté. Les cellules lignifiées présentent une organisation longitudinale :



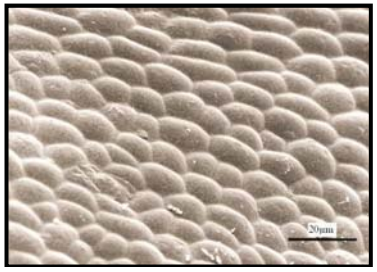
Si l'on descend dans la coupe, on peut aisément observer à une échelle plus fine, les différents tissus cités plus haut, le tégument, l'albumen, l'embryon, avec ici un vue partielle d'un cotylédon :



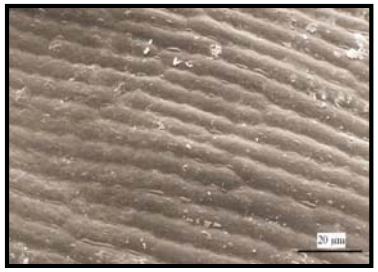
L'observation approfondie du cotylédon en coupe montre des structures vésiculaires :



Quant à l'observation de surface, à la même échelle de grossissement, elle révèle en comparaison avec celle de la radicule, la présence de cellules régulières ovales plus grosses que les cellules allongées de la radicule :

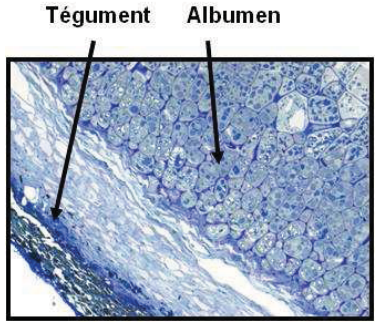


Surface du cotylédon d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)



Surface de la radicule d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

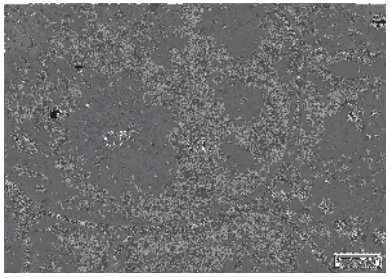
- *Microscopie optique (x 400)*



L'observation en microscopie optique d'une coupe, colorée au bleu de toluidine, confirme la présence d'une couche externe épaisse plus ou moins lignifiée.
Les cellules plus internes de l'albumen présentent des structures de réserves de type « protein bodies » mais il est difficile de distinguer de manière précise ces structures.

La microscopie à transmission électronique a permis de mieux préciser les structures observées auparavant via le microscope à balayage de surface et la microscopie optique.

En effet, l'analyse en microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence la présence au sein des cotylédons de nombreux « corps protéiques » **(CP)** et de « corps lipidiques » **(CL)** photographiés ci-dessous au niveau de cellule de cotylédons.



Cellule du cotylédon d'*A. neocaledonica* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

14,08 ± 1,07 mg/100mg de matière fraîche
15,50 ± 1,18 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

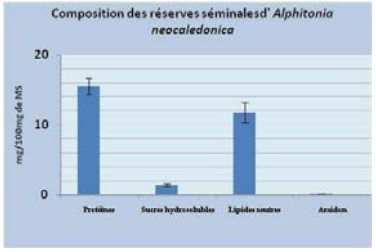
1,30 ± 0,17 mg/100mg de matière fraîche
1,36 ± 0,18 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

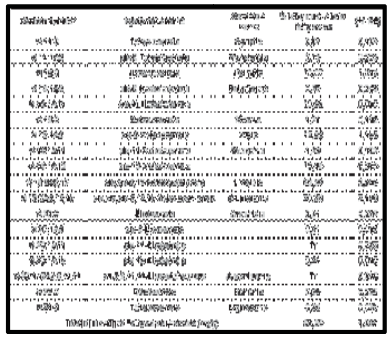
11,29 ± 1,39 mg/100mg de matière fraîche
11,76 ± 1,45 mg/100mg de matière sèche

- Composition brute en amidon

0,13 ± 0,05 mg/100mg de matière fraîche
0,14 ± 0,05 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :



L'analyse des acides gras met évidence la présence d'une grande majorité d'acides gras insaturés qui présentent un intérêt et un potentiel nutritionnel sans équivoque. De plus, elle a aussi permis de montrer l'occurrence d'acide gras très particulier et rare, des acides gras Ω5 (Bombarda et al., 2010).

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

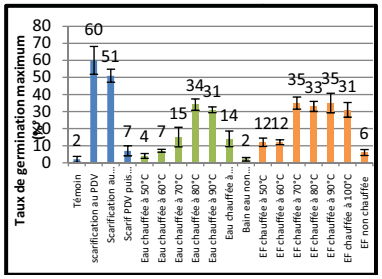
- Graine entière : 8,89 % (± 0.20).
- Graine en poudre : 9.17 % (± 0.22)

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Viabilité du lot de semence

Un seul lot étudié avec une viabilité de 76%

Germination



La première observation que l'on peut noter est que ces résultats confirment une inhibition tégumentaire à l'eau, en effet on observe une germination difficile en l'absence de prétraitement (taux de germination de 2% en 44 jours).

En comparant l'ensemble des prétraitements, on peut voir que les méthodes de scarification au papier de verre (PDV) et au scalpel obtiennent les meilleurs taux de germination final (60% au PDV soit 79% des graines viables et 51% au scalpel soit 67% des graines viables). La scarification mécanique reste la méthode la plus efficace en terme de germination maximale. Il existe bien des machines scarificatrices (« seedgun ») dont le principe est la projection de semences sur cylindre en fer en rotation. Cependant, la qualité de scarification dépend énormément de la semence (taille), mais cette solution reste intéressante pour les sociétés en charge de la revégétalisation.

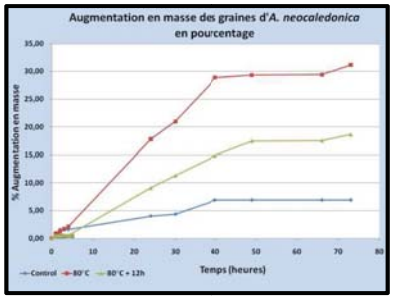
Si on s'intéresse au temps de latence :

- 4 jours au scalpel
- 5 jours au bain d'eau chaude à 80°C
- 5 jours au PDV

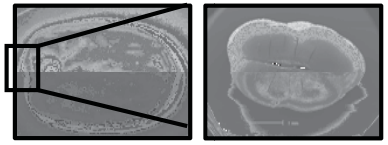
On peut voir qu'un prétraitement à l'eau chaude à 80°C reste très intéressant, en effet on obtient un taux de germination de 16% au bout du 7ème jour après le semis (9% pour PDV). Cette méthode est donc très intéressante pour la revégétalisation du fait de sa simplicité d'application et le faible investissement financier. Il suffit simplement d'insérer les semences dans un bain d'eau chaude à 80°C sans scarification préalable et stopper le chauffage après leur immersion. Puis, on les laisse refroidir pendant 12 heures avant de les semer directement.

Prise d'eau

Une étude de la prise d'eau effectuée sur des graines non scarifiées et sur des graines traitées dans un bain d'eau chaude à 80°C pendant 5 min et pendant 5 min suivi d'un trempage pendant 12 heures montre l'efficacité de ce dernier concernant la levée de l'imperméabilité de la semence et confirme donc une dormance physique des semences *d'A. neocaledonica*.

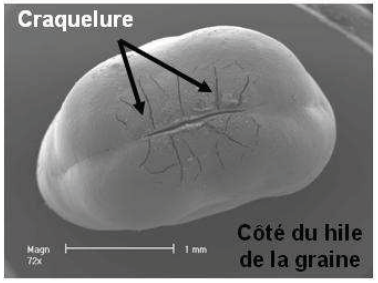


L'analyse via la microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence la formation de craquelure sur les graines traités dans un bain d'eau chaude à 80°C.



Graine d'*A. neocaledonica* observée *au MEB* (©LIVE/UNC)

Afin de mieux apprécier la présence de ses craquelures, la graine est observée verticalement et la partie du hile est agrandie.



Graine d'*A. neocaledonica* observée au MEB (©LIVE/UNC)

La formation de craquelures, après traitement dans un bain d'eau chaude à 80°C, localisées au niveau du hile de la graine, zone reconnue pour être l'une des plus fragiles du tégument de la semence confirme la dormance physique de la semence dû notamment à l'imperméabilité du tégument et donc à l'inaccessibilité à l'eau qui rend donc la reprise du métabolisme difficile.

Semis

➢ **Pour le semis en milieu naturel dégradé**, la meilleure période pour l'optimisation de la germination des semences semble être de novembre à février, période chaude et à forte pluviométrie, avec une amplitude de température jour/nuit atteignant +/- 20°C. Cependant, il faut être extrêmement prudent à ne pas semer avant un passage orageux violent, ce qui favorise le lessivage des sols, et donc la perte des semences, et diminue les chances de survie des jeunes plantules germées.

➢ **Pour le semis en pépinière**, il pourrait être très intéressant que les semis soient effectués à températures contrôlées (dans le cas présent, à 25°C), soit par l'utilisation d'une serre thermorégulée (coût excessif), soit par l'utilisation d'une étuve réfrigérée.

Pour cette proposition, la méthode est très simple : dans un bac, disposer les semences scarifiées sur un substrat qui présente une bonne capacité de rétention (vermiculite par exemple).

Arroser abondamment, et recouvrir le bac de film plastique. Mettre à l'étuve préalablement réglée à 25°C, et ne pas hésiter à rajouter de l'eau si cela semble nécessaire. Replanter ensuite les jeunes plantules germées sur le substrat de votre choix.

Si la scarification a été efficace, le taux de germination observé approchera les 50-55%.

Plantule au stade cotylédon (©LIVE/UNC)

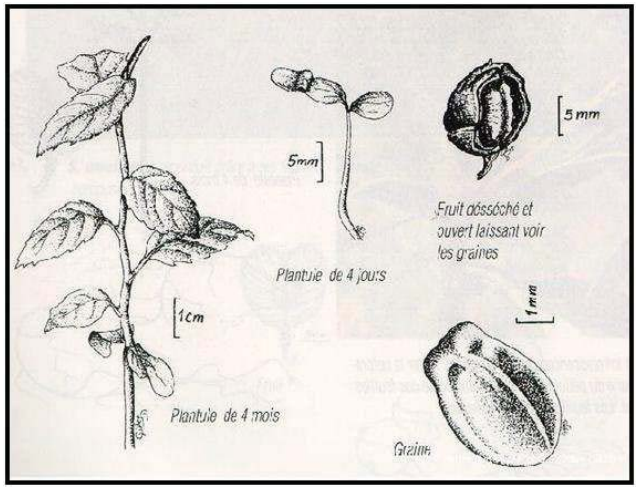
10/ Repiquage et culture des plants (Roumagnac *et al.,* 2004)

La croissance des plants est très variable en pépinière au sein d'un même lot. L'apport de topsoil apparaît nécessaire pour assurer l'inoculation symbiotique des plants et améliorer leur développement.

La croissance des plants est relativement rapide, de 10 à 15 cm/an en plantation avec des apports d'engrais, de préférence en libération lente.

Jeune plant (©LIVE/UNC)

Plants en fin de culture
(Roumagnac *et al.* 2004)



Fiche descriptive de l'espèce du fruit à la plantule (Jaffré & Pelletier, 1992)

Famille

Euphorbiaceae

Généralités sur la famille

La sous-famille compte en Nouvelle-Calédonie 212 espèces, dont **189 sont endémiques**. Elles sont réparties sur 28 genres dont 6 endémiques.

Le genre *Austrobuxus* compte 15 espèces dont 14 endémiques.

Description de l'individu adulte

- Arbuste voire arbre pouvant atteindre 15 m

Pied adulte d'*Austrobuxus carunculatus* *in situ* (©JL. Ruiz)

- Description du fruit

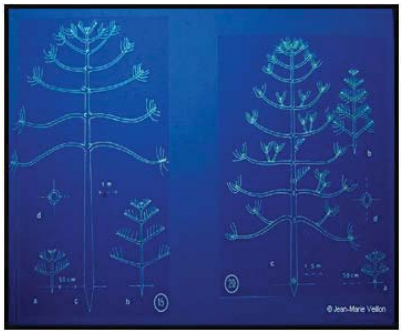
Les fruits secs déhiscents (capsule) sont en grappe par deux. Ils présentent six fentes d'ouverture dont 3 qui ouvre la loge carpellaire. On retrouve 1 graine par loge. Les loges n'en contiennent pas toujours.

Le fruit mesure 1,2-1,4 cm pédicelle compris dans la longueur et 0,7-0,9 cm de large. Son diamètre est de 0,6-0,7 cm.

Fruits matures d'*Austrobuxus carunculatus* (©D. et I. Létocart)

Particularité biologique

L'architecture de cette espèce est conforme au Modèle de Rauh :



Habitat

L'espèce se développe sur sol hyper magnésien.

Distribution géographique

Largement répandue sur l'ensemble du Territoire mais n'est abondante que sur les massifs de péridotites entre 0 et 1200 mètres.

Distribution géographique d'*Austrobuxus carunculatus*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

La période de maturation des semences s'étale de novembre à janvier.

Extraction et conditionnement des graines

Les fruits secs déhiscents sont mis à sécher au sec à la lumière ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 10 graines : 58,82 (± 1,73) mg,
soit environ 170 (± 5) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

Description de la semence

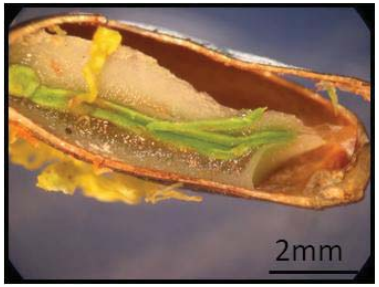
1/ Structure externe :

Les graines sont ovoïdes, noires. Elles mesurent environ 1 cm de long, 4 mm de large pour 3 mm d'épaisseur. Elle possède par ailleurs une caroncule importante (4-7 mm) formée d'une longue chevelure jaune.

Graines fertiles d'*Austrobuxus carunculatus* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La dissection de la graine révèle la présence d'un embryon volumineux qui semble chez certaine graine être pré-germé.



Coupe longitudinale de la graine d'*Austrobuxus carunculatus* (©LIVE/UNC)

La coupe transversale montre un embryon entouré d'un albumen liquide autour de l'embryon et plus ou moins solide en allant vers l'extérieur.

Coupe transversale de la graine d'*Austrobuxus carunculatus* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

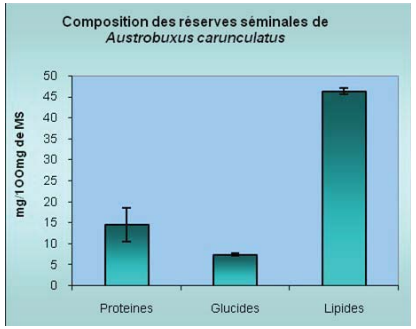
13,81 ± 3,80 mg/100mg de matière fraîche
14,59 ± 4,01 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

7,05 ± 0,34 mg/100mg de matière fraîche
7,45 ± 0,36 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

43,88 ± 0,75 mg/100mg de matière fraîche
46,35 ± 0,95 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids
C 10:0		Capric	0,32
C 12:0	Dodecanoic	Lauric	3,73
C 14:0	Tetradecanoic	Myristic	2,27
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	15,48
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadecanoic	Palmitoleic	3,44
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	3,28
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	46,88
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	19,80
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	0,25
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,27
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic		0,11
C 22:0	Docosanoic	Behenic	0,09
C 24:0	Tetracosanoic	Lignoceric	0,16
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			96,09

Il est à noter qu'une faible quantité d'acides gras présents en trace n'a pu être identifiée. Ceux-ci sont en cours d'étude.

Degré d'humidité

- Graine en poudre:
  5,32 % (± 0,31).

Il s'agit d'une graine orthodoxe.

Famille

Cyperaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 98 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 35 sont endémiques, réparties sur 25 genres. Le genre *Baumea* compte 6 espèces dont 2 endémiques de la Nouvelle-Calédonie. *Baumea deplanchei* est une espèce endémique.

Description de l'individu adulte

- Il s'agit d'une plante herbacée qui pousse en touffe. Elle peut atteindre 1m de diamètre et 80cm de hauteur.

Touffe de *Baumea deplanchei* dans son ensemble (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

  Feuilles plates et lisses se développant en éventail.
  Les feuilles sont de couleur verte glauques ou bleutées souvent brillantes.

- Description du fruit

  Les achènes s'insèrent sur la hampe florale et peuvent y rester plusieurs mois. Le fruit est rond à ovale et de petite taille (approximativement 0,3 cm de longueur). Le fruit mûr est de couleur brun foncé avec une partie jaune paille à une extrémité.

Infrutescence mûre (à gauche) et verte (à droite) de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)

Habitat

Elle se développe sur sol meuble et humide. Elle est rupicole et ripicole. On la trouve essentiellement sur maquis minier, mais on peut la rencontrer en lisière de forêt. Elle s'installe préférentiellement sur des terrains ouverts.

Distribution géographique

Largement répandue sur la grande terre, sur tous les massifs de roches ultramafiques à diverses altitudes (de la base au sommet des massifs)

Distribution géographique de *Baumea deplanchei*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- La fructification est répartie de janvier à octobre
- La floraison s'étale de novembre à aout

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

- De janvier à octobre
- Récolte des hampes pendantes ayant des fruits noirs ou brun.

Graines mûres de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)

Technique et conseil de récolte

- Au sécateur
- Récolte des épis

Extraction et conditionnement des graines

Actuellement, il semble que la meilleure technique d'extraction des graines soit de tapoter les hampes et de les frotter manuellement sur un tamis fin afin de faire tomber les graines. Afin de séparer les graines des derniers déchets et poussières on peut manuellement utiliser la technique de nivelage sur plateau en faisant glisser les graines (tout en tapotant le plateau) ou encore utiliser le vacuum cleaner.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 0,2759 (± 0,005) g, soit 362 (± 7) graines/g.

Techniques de conservation

- A conserver après séchage en boites plastiques hermétiques à 15°C sous gel de silice

Description de la semence

1/ Structure externe :

La taille des semences est de 0,3 x 0,2 cm pour 1 mm d'épaisseur. Cette semence présente une forme ovale bombée, avec une extrémité de couleur jaune clair et l'autre extrémité avec des poils.
Elle est de couleur noire à brune et présente un aspect lisse.

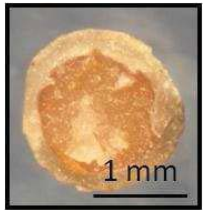
Achène de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)

Coupe longitudinale d'un achène de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)

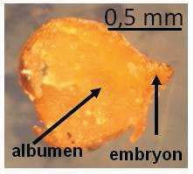
2/ Structure interne

Graine de type albuminée (observation d'un embryon très petit placé à une extrémité).

Graine de *Baumea deplanchei* après scarification (©LIVE/UNC)



Coupe transversale de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)



Coupe longitudinale de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)

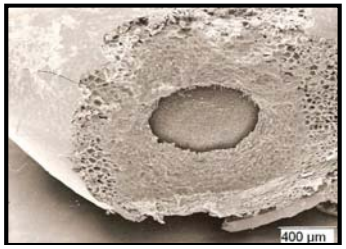
La dissection met en évidence une couche tégumentaire épaisse, cette dernière étant un inhibiteur mécanique de la germination de la graine. Après scarification on obtient une graine ronde de couleur blanche.

L'embryon de petite taille est à une extrémité de la graine et de forme triangulaire. Le tissu nourricier de couleur blanche occupe une grande partie de la graine.

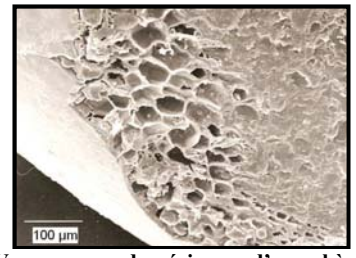
3/ Ultrastructure

- *Microscopie électronique de surface*

La dureté du fruit n'a permis au cours de cette étude que de l'effleurer permettant ainsi de caractériser les couches constitutives du péricarpe et révélant la position interne de la graine :



Vue générale d'un achène de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)



Vue en coupe du péricarpe d'un achène de *Baumea deplanchei* (©LIVE/UNC)

Le péricarpe est entièrement sec, on peut y distinguer une couche externe fine mais imperméable puis une large couche de cellules de grande taille.

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

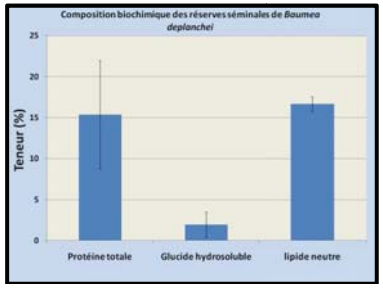
14,13 ± 6,1 mg/100mg de matière fraîche
15,36 ± 6,6 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

1,79 ± 1,40 mg/100mg de matière fraîche
1,95 ± 1,52 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

15,37 ± 0,86 mg/100mg de matière fraîche
16,65 ± 0,93 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides neutres :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids
C 8:0		Caprylic	0,65
C 10:0		Capric	5,44
C 14:0	Tetradecanoic	Myristic	0,10
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	6,96
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadecanoic	Palmitoleic	0,48
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	2,69
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	59,61
C 18:1Δ11	cis-11-Octadecanoic	Vaccenic	1,64
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	11,86
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,48
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic		0,99
C 20:2Δ11,14	cis,cis-11,14-Eicosadienoic		0,09
C 22:0	Docosanoic	Behenic	0,18
C 22:0	Docosanoic	Lignoceric	0,07
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			91,24

Il faut noter la grande proportion d'acides gras insaturés qui représentent plus de 70% du total des acide gras. De plus, ces derniers sont intéressants d'un point de vue nutritionnelle.
Il est aussi à noter qu'une faible quantité d'acides gras présents en trace n'a pu être identifiée. Ceux-ci sont en cours d'étude.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine entière : 8,36 % (± 0.52).
- Graine en poudre : 8,02 % (± 0.21)

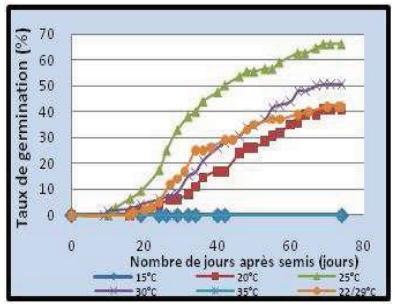
Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Viabilité du lot de semence

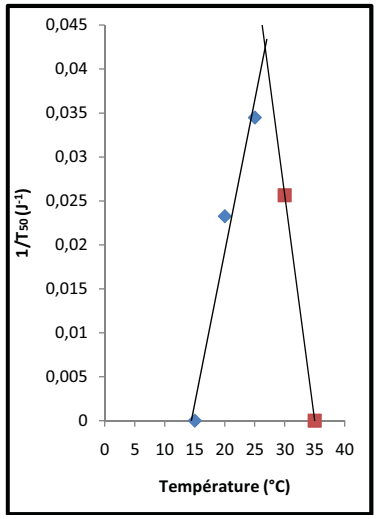
Un seul lot étudié avec une viabilité de 41% (± 9%)

Germination

La température optimale est de 27°C ; L'intervalle de température est de 15°C à 35°C. L'inhibition de la germination par le péricarpe des achènes est totale. En effet, il est préférable de scarifier les semences de *Baumea deplanchei* avant de les semer soit à l'aide d'un scarificateur mécanique ou bien de les abraser entre deux feuilles de papiers de verre. Pour une bonne scarification, il faut faire apparaître la couche blanche qui se trouve sous le péricarpe de l'achène.



Courbes de germination de *Baumea deplanchei* à différentes températures



Effets de la température sur la germination de *Baumea deplanchei*

Famille

Myrtaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie, 237 espèces, dont **233 sont endémiques**. Cette famille est composée d'arbres, arbustes, arbrisseaux ou lianes.

C'est la famille la plus importante de Nouvelle Calédonie. Elle compte des genres à très large distribution: *Eugenia* et *Syzygium*, mais également des genres endémiques: *Arillastrum*, *Carpolepis*, *Cloezia*, *Pleurocalyptus* et *Purpureostemon* (de la sous-famille des Leptospermoidées, possédant des fruits secs, centrée sur l'Australie) et *Cupheanthus* et *Myrtastrum* (de la sous-famille des Myrtoidées possédant des fruits charnus, à large distribution tropicale), des genres subendémiques : *Archirhodomyrtus, Piliocalyx, Uromyrtus* ; des genres australiens : *Babingtonia, Callistemon, Melaleuca* ; ainsi que des genres australo-papous : *Austromyrtus, Rhodomyrtus, Xanthostemon*. Les 7 genres restant ont des distributions principalement pacifique, indo-malésienne, indo-australienne.

Cette famille est parfaitement adaptée aux sols pauvres. Elle présente une gamme importante d'espèces susceptibles d'être utilisées pour la revégétalisation. Mais compte tenu de leur faible pouvoir enrichissant du sol et du risque de toxicité vis-à-vis des autres espèces, elles ne devront être utilisées qu'en mélange avec des espèces d'autres familles (Jaffré & Rigault, 1991).

Le genre *Carpolepis* endémique à la Nouvelle-Calédonie est composé de 3 espèces.

- Arbuste ou arbre pouvant atteindre 18-20m.

Pied adulte de *Carpolepis laurifolia* var. *laurifolia in situ* (©I. & D. Létocart)

- Description des feuilles

Feuilles pétiolées, verticillées par 3, coriaces, obovales, 8-17 x 2,5-6, obtuses ou arrondies au sommet, en coin ou atténuées à la base; nervures visibles.

Pétiole de 1-3 cm, nervures plus ou moins visibles au-dessus, plus distinctes en dessous.

Les feuilles des jeunes individus sont généralement beaucoup plus grandes que celles des adultes.

Les derniers rameaux des adultes sont anguleux. Les feuilles et les rameaux jeunes sont souvent "poilus", avec des poils argentés.

Feuillage de *Carpolepis laurifolia* var. *laurifolia* (©A. Cherrier)

- Description des fleurs

Fleurs courtement pédicellées, jaune vif, groupées par 2-3 sur des inflorescences.

Inflorescences composées de 3-5 groupes de 3 inflorescences élémentaires; étamines 45 – 100.

Pédoncule des inflorescences de 1 mm de diamètre.

Inflorescence de *Carpolepis laurifolia* var. *laurifolia* (©J.L. Ruiz)

- Description du fruit

Fruits en capsules lignifié déhiscent de 1 cm de diamètre fortement bombés.

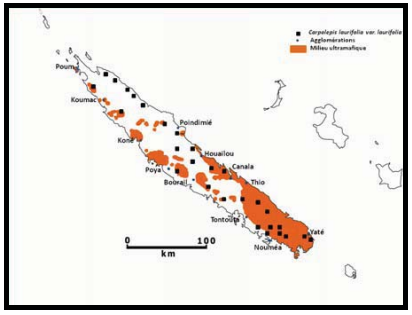
Fruits de *Carpolepis laurifolia* var. *laurifolia* (©A. Cherrier)

Habitat

L'espèce se développe dans la forêt dense humide sur sol plus ou moins érodé ou ferrallitique gravillonnaire sur substrat ultramafique ou sur substrat sédimentaire.

Distribution géographique

Largement répandue depuis 5 mètres et jusqu'à 1600 mètres sur la Grande Terre.



Distribution géographique de *Carpolepis laurifolia* var. *laurifolia*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2004.

Technique et conseil de récolte

Floraison de décembre à mars, avec un maximum en janvier et fructification de décembre à mai.

Extraction et conditionnement des graines

Les fruits secs déhiscents sont mis à sécher au sec à la lumière ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 1000 graines : 111 (± 1,2) mg, soit environ 9009 (± 100) graines/g.

Techniques de conservation

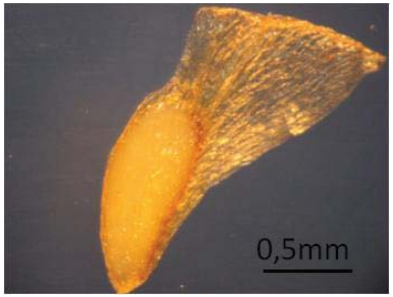
- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante le taux de germination chute plus rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

Les graines présentent une partie ailée de couleur marron clair. Elles mesurent 0,25-0,35 x 0,05-0,1 cm. La partie ailée facilite sans aucun doute une dissémination par le vent puisqu'elle occupe près de la moitié de la surface de la graine.
La distinction entre les graines fertiles et infertiles se fait par la présence d'une zone bombée correspondant à l'embryon.

Ensemble de graines fertiles et non fertiles



Graine fertile de *Carpolepis laurifolia* var. *laurifolia* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La dissection de la graine révèle la présence de deux tissus : le tégument et l'embryon qu'il renferme.
Il s'agit donc d'une graine de type albuminée.

La structure fine du tégument permet une accessibilité aisée à l'eau.

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé 12.2004 :

- *Composition brute en protéines*

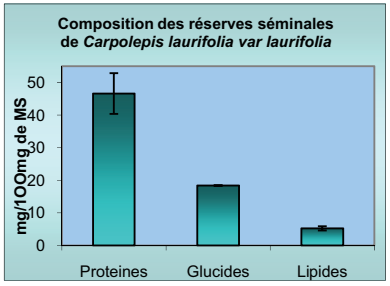
38,76 ± 5,20 mg/100mg de matière fraîche
46,61 ± 6,25 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

15,3 ± 1,20 mg/100mg de matière fraîche
18,4 ± 1,40 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides neutre*

4,39 ± 0,53 mg/100mg de matière fraîche
5,28 ± 0,64 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	8,70
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	3,24
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	9,99
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	70,46
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrie	α-Linolenic	1,26
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	1,21
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic		0,21
C 22:0	Docosanoic	Behenic	1,20
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			96,26

Il est à noter qu'une faible quantité d'acides gras présents en trace n'a pu être identifiée. Ils sont en cours d'étude.

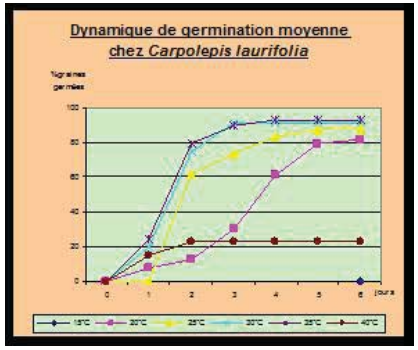
Degré d'humidité

- Graine en poudre :
  16,84 % (+/- 0.46).

Germination

Les graines de *Carpolepis laurifolia* var *laurifolia* germent très rapidement et sur une courte période.

En effet, les graines germent dès le 1er jour pour des températures comprises entre 20 et 40°C.



C'est d'ailleurs dans l'intervalle 20 à 35°C que l'on retrouve les meilleurs taux de germination, de l'ordre de 90%, avec un optimum de germination situé entre 30°C et 35°C. Au-delà de cette température, le taux de germination chute de trois fois et aucune germination au-delà de 30 jours n'est observée à 15°C.

Graine germée après une journée à l'étuve à 25°C

Famille

Casuarinaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 11 espèces réparties sur 2 genres. Toutes les Casuarinacées du territoire sont associées à des bactéries actinomycètes fixatrices d'azote, du genre *Frankia* ce qui contribue à améliorer la teneur en azote du sol.

Le genre *Gymnostoma* quant à lui est représenté par 8 espèces toutes endémiques

Le genre *Casuarina* compte 3 espèces dont deux endémiques, parmi celles-ci figure *Casuarina teres.*

Description de l'individu adulte

- Arbuste à arbre de 3 à 7 mètres.
- Description des feuilles

Feuilles réduites à de petites écailles triangulaires.

- Description de la fleur

Fleurs réduites, unisexuées. Inflorescence mâle en chatons d'étamines, et femelle en cônes de gynécées.

- Description du fruit

Les fruits résultent du développement des cônes femelles lignifiés. Ils sont constitués de loges (1 loge contenant 1 graine ailée).

Habitat

On retrouve l'espèce sur des sols issus de roches ultramafiques.

Distribution géographique

Distribution géographique de *Casuarina teres*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Casuarina teres est principalement localisée sur la zone Voh-Koné et il se développe prioritairement sur substrat ultramafique.

Technique et conseil de récolte

Ils peuvent être récoltés lorsqu'ils commencent à brunir ou à rougir. Ils s'ouvrent en quelques jours à température ambiante libérant ainsi les semences mûres.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec sous des néons ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 0,10 g,
soit environ 977 (± 1) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

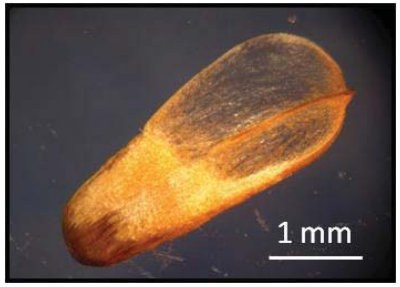
- A température ambiante le taux de germination chute rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

La distinction entre les ovulodes et les graines fertiles n'est pas aisée à l'œil nu, seule la dissection permet de le distinguer. Le lot à disposition contenait malheureusement une forte proportion d'ovulodes, de semences non viables ce qui a rendu les expérimentations de germination difficilement interprétables.

Les graines sont fortement ailées et marrons claires. *C. teres* présente une forme relativement ovoïde, elles mesurent 4-5 x 1,5-2 mm. La graine est de couleur jaune clair, elle présente une partie ailée importante, plate, fine et fibreuse. A l'autre extrémité, la semence est bombée au niveau de l'embryon. La partie ailée facilite sans aucun doute une dissémination par le vent puisqu'elle occupe plus de 2/3 de la surface de la graine.

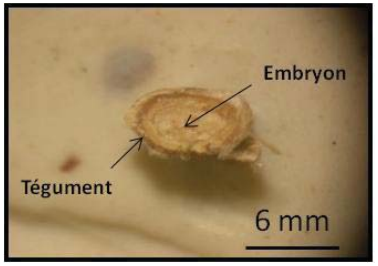


Graine de *Casuarina teres* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La semence présente une couche tégumentaire relativement fine.

Les coupes montrent la présence d'un large embryon et l'absence d'albumen, la graine est donc de type exalbuminé.



Coupe transversale d'une graine de *Casuarina teres* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

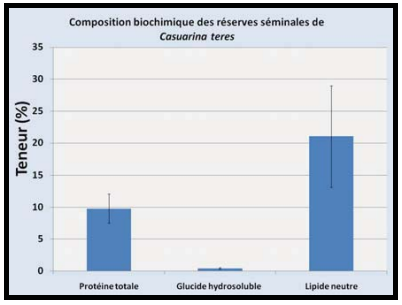
8,81 ± 2,06 mg/100mg de matière fraîche
9,79 ± 2,29 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

0,40 ± 0,11 mg/100mg de matière fraîche
0,44 ± 0,12 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

18,93 ± 7,12 mg/100mg de matière fraîche
21,04 ± 7,91 mg/100mg de matière sèche



Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine :
  11,54 % (± 2.12).
- Graine en poudre :
  10,02% (± 2).

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe ou intermédiaire.

Viabilité du lot de semence

Le taux de viabilité du lot est de 1%. Le lot contenait en effet de nombreux ovulodes.

Germination

L'étude de l'influence de différents traitements a été réalisée. Ces traitements sont un traitement à :

- Eau chaude : 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C
- Eau bouillante : 1,2, 5 min
- H_2SO_4 98% dilué au ¼ : 1,5 ,10 min
- Scarification au scalpel
- Eau fumigée : 6, 12, 24h
- Pourrissement pendant 2 mois dans de l'eau à température ambiante.

Aucune germination n'a été notée après 40 jours d'observation, cela en raison du taux de viabilité quasi-nulle des graines.

Costularia comosa

Famille

Cyperaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie, 98 espèces réparties sur 25 genres dont 35 endémiques.

Le genre *Costularia* est représenté par 12 espèces **toutes endémiques** dont les espèces *C. comosa* et *C. pubescens*.

Sur les massifs ultramafiques, les Cyperaceae constituent la principale composante de la flore herbacée.

Sur 33 espèces des maquis miniers dont 27 endémiques à la Nouvelle-Calédonie, seulement 6 se réinstallent progressivement sur les mines dégradées ou dénudées : *C. comosa*, *C. pubescens*, *B. deplanchei*, *Schoenus neocaledonicus*, *S. juvenis* et *Lepidosperma perteres*.

Description de l'individu adulte

- Plante herbacée se développant en touffes pouvant être de grande taille.

Pied adulte *in situ* de *Costularia comosa* (©JL. Ruiz)

- Description des feuilles

Feuilles planes d'environ 1 cm de large à la base, très effilées au sommet. Présence d'une nervure centrale.

Feuillage de *Costularia comosa* (©JL. Ruiz)

- Description du fruit

Les fruits sont secs indéhiscents de type achènes verts quand ils sont jeunes puis marrons à maturité sur de grands panicules pouvant atteindre 1 mètre de hauteur.

Fruits matures de *Costularia comosa* (©JL. Ruiz)

Habitat

L'espèce se développe sur des sols bruns hypermagnésiens et latéritiques.

Distribution géographique

Costularia comosa est distribuée sur la totalité de la « Grande Terre ».

Distribution géographique de *Costularia comosa*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

La production de graines a principalement lieu de décembre à février.

L'idéal est la récolte de l'ensemble de la hampe florale.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec sous des néons ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 100 fruits : 19,3 (± 0,37) mg,
soit environ 5180 (± 100) fruits/g.

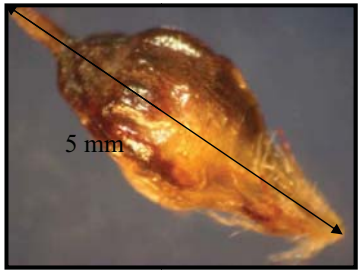
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante le taux de germination chute plus rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

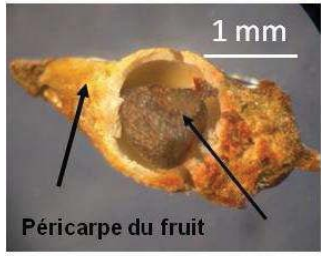
Il faut bien admettre que cette description est basée sur le fruit puisqu'il s'agit d'un achène. Par ailleurs, les analyses ont également été réalisées sur le fruit entier :



Achène de *Costularia comosa* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La semence est contenue dans un fruit dont le péricarpe est très épais laissant présager de la difficulté de l'accessibilité à l'eau pour l'embryon. De plus, cette enveloppe laisse entrevoir une graine de taille très réduite.



Coupe longitudinale d'un achène de *Costularia comosa* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé M10 :

- *Composition brute en protéines*
  7,33 ± 3,23 mg/100mg de matière fraîche

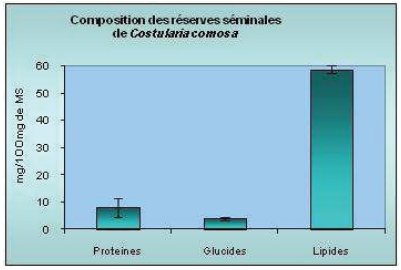
7,99 ± 3,52 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

3,54 ± 0,73 mg/100mg de matière fraîche
3,86 ± 0,80 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

53,85 ± 1,34 mg/100mg de matière fraîche
58,73 ± 1,46 mg/100mg de matière sèche



Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine entière :
  8,31 % (+/- 1.25).

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Famille

Rhizophoraceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 13 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 3 sont endémiques, réparties sur 4 genres. Le genre *Crossostylis* compte 4 espèces en Nouvelle-Calédonie dont 3 sont endémiques. Le nom local est « palétuvier de montagne ».

Feuilles de *Crossostylis grandiflora* (©LIVE/UNC)

Description de l'individu adulte

- Arbres, arbustes avec souvent de courtes échasses à la base du tronc avec des racines aériennes.

Allure générale de *Crossostylis grandiflora* (©LIVE/UNC)

Branchage de *Crossostylis grandiflora* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

Feuilles simples entières penninervées opposées par deux.

- Description de la fleur

Grande fleur rose et blanche. Les 4 sépales sont rose-vif à l'extérieur, blancs à l'intérieur. Les 4 pétales et étamines sont blancs, le style est vert pale. Le calice est de couleur rosée. Placentation centrale à nombreux ovules.

Habitat

Elle se développe en forêts denses humides ou maquis sur substrat ultramafique. Elle s'installe préférentiellement sur des terrains ultrabasiques, et siliceux.

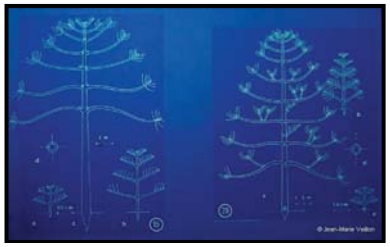
Distribution géographique

Largement répandue sur la Grande Terre, jusqu'à 600 mètres d'altitude.

Distribution géographique de *Crossostylis grandiflora*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle de Rauh.



Phénologie

Floraison : septembre à janvier

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 35,47 (± 1,2) mg, soit 282 (± 10) graines/g.

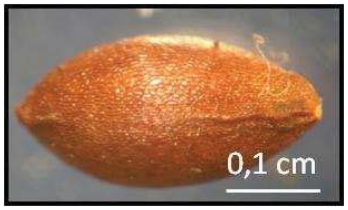
Techniques de conservation

Froid sec à 4°C.

Description de la semence

1/ Structure externe :

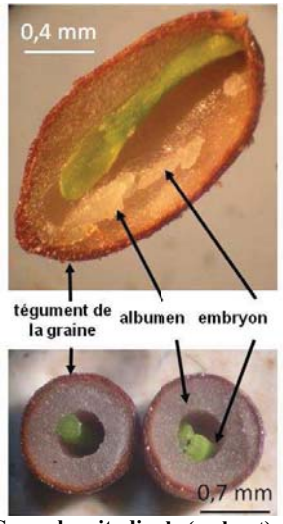
La taille des semences est de 0,2-0,3 x 0,1 cm pour 1 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ovale, avec une face plus bombée. La graine est de couleur marron avec un aspect plutôt lisse.



Graine de *Crossostylis grandiflora* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

Graine de type albuminé (observation d'un embryon vert placé au milieu du tissu nourricier).



Coupe longitudinale (en haut) et transversale (en bas) de *Crossostylis grandiflora* (©LIVE/UNC)

La dissection met en évidence une couche tégumentaire plutôt fine de couleur marron.
L'embryon est axile, c'est-à-dire que celui-ci est placé dans l'axe de la graine, la radicule étant dirigée vers la base de la graine. Il est de couleur verte.
Le tissu nourricier blanchâtre occupe une bonne partie (3/4) de la graine.

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

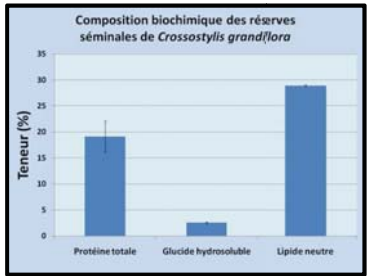
17,39 ± 2,77 mg/100mg de matière fraîche
19,08 ± 3,04 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

2,36 ± 0,12 mg/100mg de matière fraîche
2,58 ± 0,14 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

26,34 ± 0,13 mg/100mg de matière fraîche
28,90 ± 0,14 mg/100mg de matière sèche



L'étude de la composition biochimique des réserves montre que la semence est une semence oléagineuse et qu'elle contient essentiellement des lipides et des protéines.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine entière :
  7,98 % (+/- 0.18).

Il s'agirait donc d'une graine de type orthodoxe (expérience de germination à mener pour vérification).

Famille

Euphorbiaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 209 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 188 sont endémiques, réparties sur 28 genres en Nouvelle-Calédonie dont 6 endémiques. Le genre *Croton* compte 2 espèces dont 1 endémique de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbrisseau ou petit arbre pouvant atteindre 8-10 m, dioïque, contenant une gomme claire devenant noirâtre au contact de l'air.

Vue d'ensemble de *Croton insularis* pointe Maa (©G. Gateblé)

- Description des feuilles
  Feuilles pétiolées, ovées ou lancéolées, 2-8 x 0,5-4 cm, aiguës ou obtuses généralement acuminées au sommet, aiguës à la base. Elles sont de couleur vert sombre dessus, gris argenté dessous, devenant jaune orangé en vieillissant. Elles comportent 4-6 paires de nervures secondaires, peu visibles.

Feuillage de *Croton insularis* à Pindaï (©J. Barrault)

- Description de la fleur
  Les fleurs se présentent sous la forme d'inflorescences mixtes terminales. Elles sont garnies de poils écailleux. On distingue les males des femelles. Les males se composent de 12 à 15 étamines et les femelles possèdent des pétales très petits et des stigmates bifides. Elles sont de couleur blanchâtre à jaune pâle.

Inflorescence de *Croton insularis* (©JL. Ruiz)

.

- Description du fruit
  Les fruits sont sous formes de capsules ovoïdes ou sphériques mesurant 5-6 mm et renferment une graine de 4 x 3 mm.

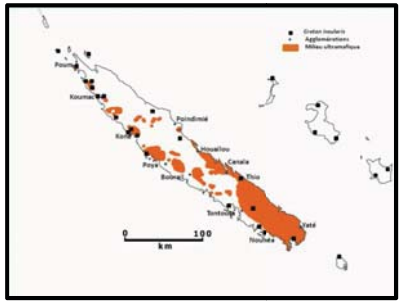
Fruits (©JL. Ruiz)

Habitat

Elle se développe aussi bien en forêts humides, dans les formations sclérophylles, qu'en maquis miniers. Elle s'installe sur des sols plus ou moins profonds ou érodés sur divers substrats.

Distribution géographique

Largement répandue sur l'ensemble du territoire, Grande terre et Iles loyautés. Elle est présente à des faibles altitudes de 5 à 600 mètres.



Distribution géographique de *Croton insularis*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle de Kwan-Koriba

Phénologie

- Floraison et fructification étalées sur l'ensemble de l'année.

Données quantitatives

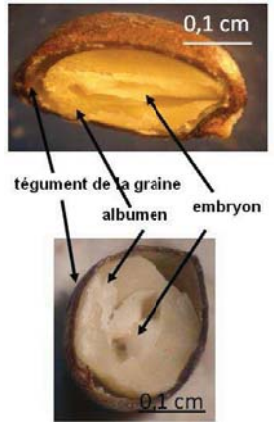
Poids de 100 graines : 0,633 (± 0,05) g,
soit 158 (± 7) graines/g.

Description de la semence

1/ Structure externe :
La taille des semences est de 0,3-0,4 x 0,1-0,2 cm pour 1 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ovale, avec une face bombée. On peut avoir aussi une tâche claire à une extrémité de la graine, le hile.
La graine est de couleur marron clair et a un aspect lisse.

Face dorsale et ventrale d'une graine de *Croton insularis* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne
Graine de type albuminée (observation d'un embryon placé au milieu du tissu nourricier).



Coupe longitudinale (en haut), transversale (au centre) et embryon (en bas) d'une graine de *Croton insularis* (©LIVE/UNC)

La dissection met en évidence une couche tégumentaire fine, de couleur marron foncé facilement détachable. L'embryon est axile, c'est-à-dire que celui-ci est placé dans l'axe de la graine, la radicule étant dirigée vers la base de la graine.

Cunonia deplanchei

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces, **toutes endémiques**, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbuste de 2 à 4 mètres

- Description des feuilles

Feuilles opposées, trifoliolées, nettement pétiolées (1.5-3 cm). Folioles sessiles de 3-10 x 2-4 cm, légèrement dentelées dans la moitié supérieure et en coin à la base, de forme ellipsoïde, glabres. Nervures saillantes sur la face inférieure. Stipule à pubescence éparse sur la face inférieure.

- Description de la fleur

Inflorescences en pseudo-grappes de 4-6 cm, de couleur rose vif. Fleurs à 5 sépales, 5 pétales, 10 étamines, ovaire supère, pistil glabre à deux styles persistant sur le fruit.

Vue d'un rameau avec inflorescences de *Cunonia deplanchei* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Infrutescence de 5cm de long chacune, en grappe de 35 (±5) fruits, avec un pédoncule de 2cm de long sur 0,2cm de diamètre.

Infrutescence de *Cunonia deplanchei* (©LIVE/UNC)

Fruit de *Cunonia deplanchei* (©LIVE/UNC)

Fruits secs déhiscents à deux fentes s'ouvrant du haut vers le bas maintenus par la pointe basale à valve glabre.

Distribution géographique

La répartition de *Cunonia deplanchei* est restreinte pour l'instant au Grand Sud de la Nouvelle-Calédonie.

Distribution géographique de *Cunonia deplanchei*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 34,5 (± 0,89) mg,
soit 2900 (± 75) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et au sec pendant plusieurs mois (le taux de germination est de 80% après 5 mois de conservation à atmosphère ambiante puis chute à 10% quatre mois plus tard).

Description de la semence

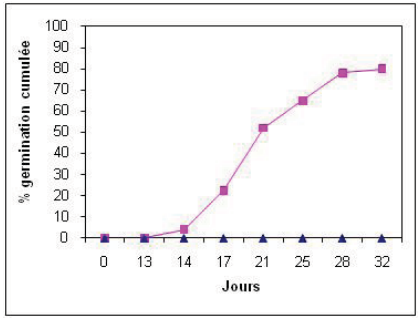
La semence présente une forme grossièrement ovoïde, sa taille variant de 1,8-2 x 0,8-1 mm.

La graine présente une partie ailée très étroite, plate (rôle dans la dissémination par le vent) de couleur marron clair et une partie de forme ovale bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers de couleur marron plus foncé occupant plus de 70% de la surface de la graine.

Graine de *Cunonia deplanchei* (©LIVE/UNC)

Germination

Du fait d'une faible quantité de graines, seule une expérience de germination a pu être menée à 25°C à l'obscurité ou à la lumière.



Graphique représentant la germination en fonction du temps des graines de *C. deplanchei* à 25°C à l'obscurité (▲) ou à la lumière (■)

Les résultats montrent une germination vers le 14ème jour à la lumière. Le taux maximal de germination est atteint après 32 jours de suivi.

Il est important de noter qu'à l'obscurité, cette espèce ne germe pas. Il s'agit donc d'une graine à photosensibilité positive.

Graine germée de *Cunonia deplanchei* (©LIVE/UNC)

Il est intéressant de noter que la zone de sortie de la radicule est située dans la partie basse comme pour les espèces du genre *Geissois* mais à l'inverse de celles du genre *Pancheria.*

Remarque : Aucune autre étude spécifique n'a été à ce jour menée sur cette espèce faute de quantité suffisante.

Cunonia macrophylla

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces, **toutes endémiques**, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle Calédonie contre 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle Calédonie contre 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle Calédonie contre 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbre de 3 à 4 mètres le plus souvent monocaule pouvant atteindre 8 mètres.

Plant adulte *in situ* de *Cunonia macrophylla* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

Feuilles opposées, composées pennées à 2-3 paires de folioles latérales et une foliole terminale, parfois trifoliolées, à pétiole net long de 3-5 cm. Folioles coriaces légèrement dentelées, de 5-15 x 2-6 cm, pétiolulées.
Stipule cordiforme de 1-3 cm, glabre sur la face inférieure.

- Description de la fleur

Inflorescence en pseudo-grappes, en paires opposées sur des branches portant aussi des feuilles en paires opposées. Rachis de la partie florifère plus long que le pédoncule. Fleurs de couleur verte à jaune, grandes pour le genre (5 sépales, 5 pétales, 10 étamines, ovaire supère, style à deux branches).

Inflorescence en pseudo-grappe de *Cunonia macrophylla* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Fruits déhiscents de couleur verte à l'état jeune virant au brun. Valve du fruit glabre. Chaque fruit contient 25 (±5) graines fertiles.

Fruit et graines fertiles et infertiles de *Cunonia macrophylla* (©LIVE/UNC)

Habitat

On retrouve l'espèce dans les forêts denses humides, les fourrés secondaires, ainsi que dans les maquis miniers (Jaffré & Pelletier, 1992), sur roches ultrabasiques.

Distribution géographique

Cette espèce est bien répandue dans tout le sud de la « Grande Terre » dès le Mont Sindoa et se retrouve tant à faible altitude qu'à des altitudes allant jusqu'à 1200 mètres.

Distribution géographique de *Cunonia macrophylla*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

La récolte des semences doit intervenir seulement lorsque les fruits ont atteint le stade de maturité physiologique (mars-avril) mais avant qu'ils ne soient ouverts, laissant échapper les graines ailées. Les infrutescences doivent donc être placées dans un sachet pour la collecte.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 47,61 (± 1,13) mg,
soit 2100 (± 50) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et sec pendant plusieurs mois

Description de la semence

1/ Structure externe :

La semence est de couleur marron foncé révélant la présence possible d'un grand nombre de polyphénols. Sa taille varie de 0,1-0,15 x 0,3-0,4 cm pour une épaisseur de 1 mm. La graine présente une partie ailée très étroite, plate (rôle dans la dissémination par le vent) et une partie de forme ovale bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers.
Le tri visuel des graines d'aspect fertile et stérile est aisé du fait de la couleur plus foncée des graines fertiles avec une zone embryonnaire nettement bombée.

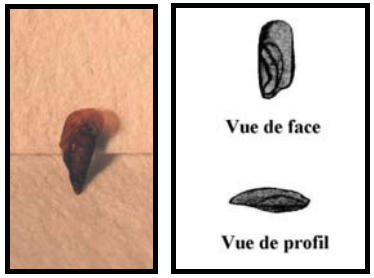
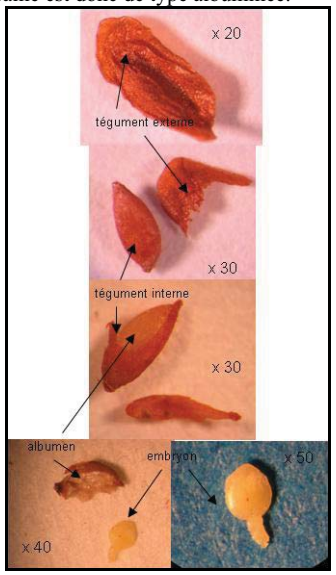


Photo et dessins de la graine de *Cunonia macrophylla* d'après Fogliani et al. (2004)

Graine entière de *Cunonia macrophylla* d'après Fogliani et al. (2004)

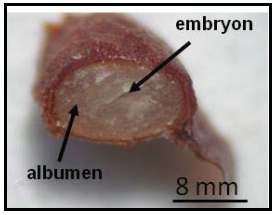
2/ Structure interne :

La dissection de la semence présente une première couche tégumentaire externe et une couche tégumentaire interne.
L'amande de la graine est constituée d'un albumen de volume important dans lequel est contenu l'embryon de couleur plus jaunâtre, la graine est donc de type albuminée.



Photos à la loupe binoculaire de dissection d'une semence de *C. macrophylla* mettant en évidence les différentes couches constitutives de la semence entourant l'embryon (©LIVE/UNC).

Cette structure est confirmée par la coupe transversale qui permet de situer l'embryon au niveau de l'albumen :

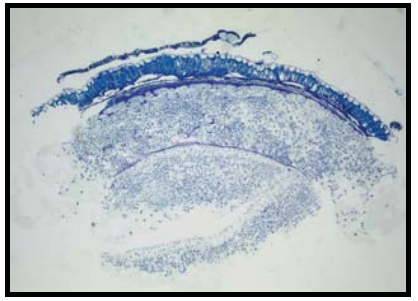


Coupe transversale d'une graine Graine entière de *Cunonia macrophylla* (©LIVE/UNC)

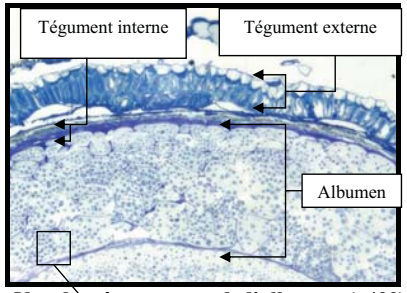
3/ Ultrastructure

- *Microscopie optique (x 400)*

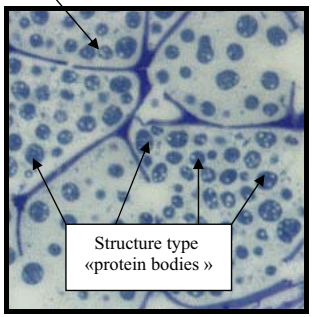
La microscopie optique a permis de mettre en évidence les couches tégumentaires. Une externe épaisse et l'une interne plus fine. L'albumen relativement épais présente au sein de ses cellules des structures de type « protein bodies »



Vue globale de la coupe (x200)

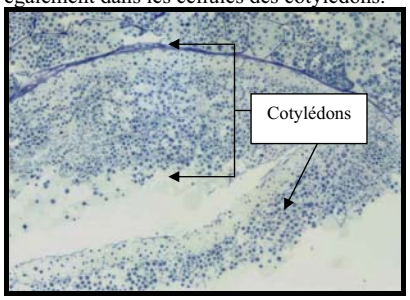


Vue des téguments et de l'albumen (x400)



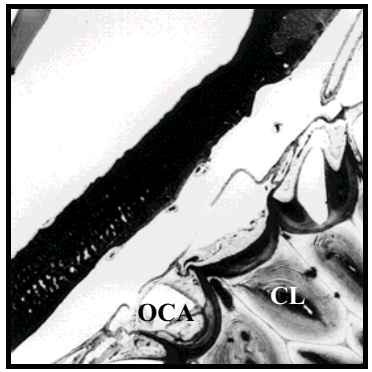
Cellules de l'albumen en zoom

Les structures « protein bodies » se retrouvent également dans les cellules des cotylédons.

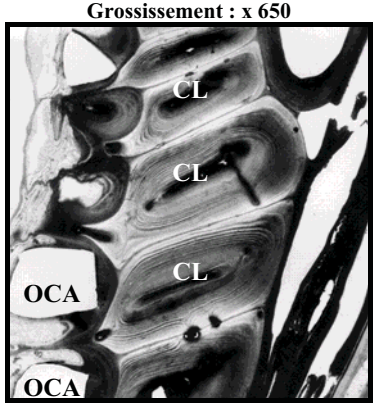


- *Microscopie électronique à transmission*

Celle-ci a permis de préciser les différentes structures observées en microscopie optique. De l'extérieur vers l'intérieur :

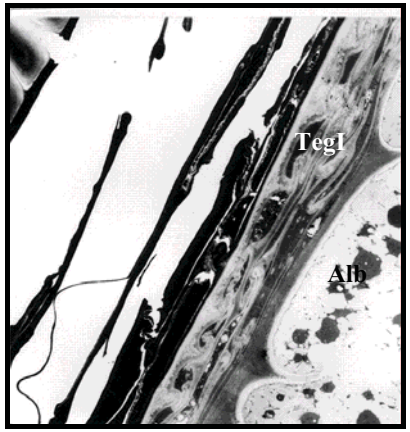


Grossissement : x 650

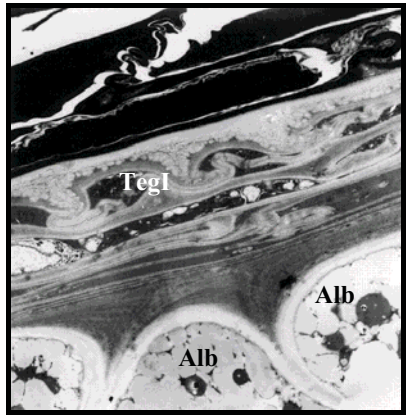


Grossissement : x 650

On distingue sur ces deux premières photos, la structure du tégument externe qui présente des cristaux d'oxalate de calcium (OCA) en forme de dalles ainsi que des cellules lignifiées (CL) donnant sa structure rigide et un peu plus épaisse à ce tissu.



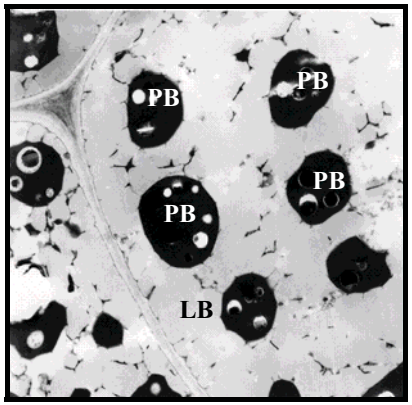
Grossissement : x 650



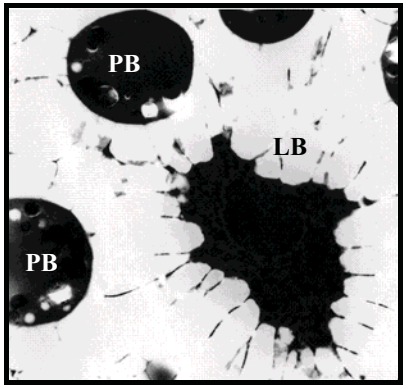
Grossissement : x 1550

L'analyse du tégument interne (TegI) montre une structure longitudinale délimitant les cellules de l'albumen (Alb).

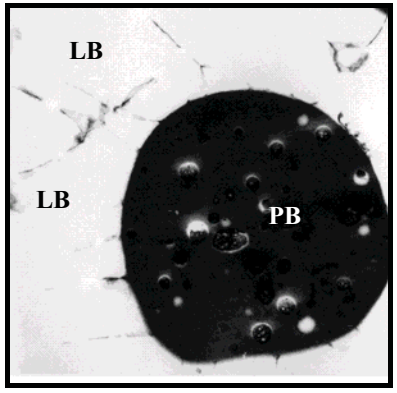
Observation de l'albumen



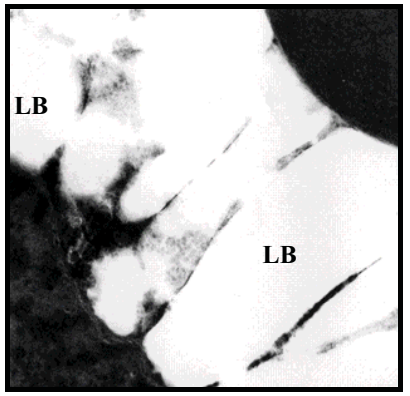
Grossissement : x 1950



Grossissement : x 3400

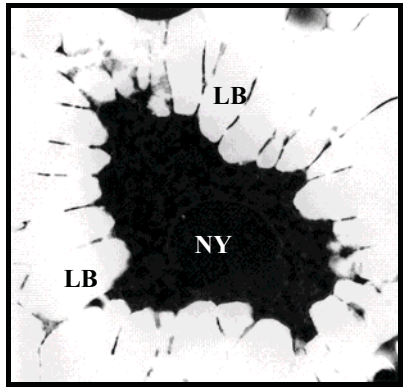


Grossissement : x 6300



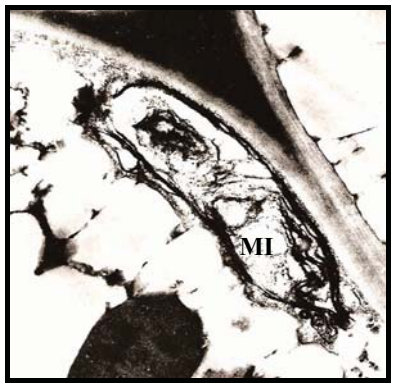
Grossissement : x 15500

L'observation des cellules de l'albumen révèle l'existence de vésicules type « protein bodies » (PB) mais également des gouttelettes lipidiques en quantité importantes (LB), ce qui est confirmé par une quantité de lipides estimés à près de 40% du poids sec.



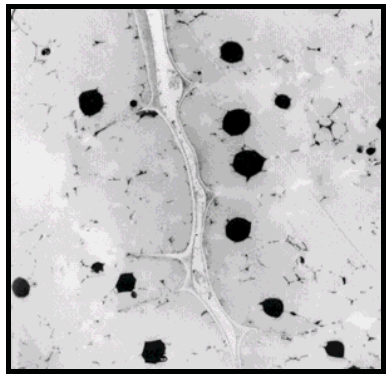
Grossissement : x 4600

D'autres structures comme une mitochondrie (MI) ou ce qui semble être un noyau (NY) ont pu être observées :



Grossissement : x 6300

Observation de la zone cotylédonaire



Grossissement : x 1150

Les cellules cotylédonaires apparaissent encore plus riches en lipides et moins qu'en vésicules riches en protéines. Par ailleurs les cellules sont de plus petite taille.

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé 17.2005 :

- *Composition brute en protéines*

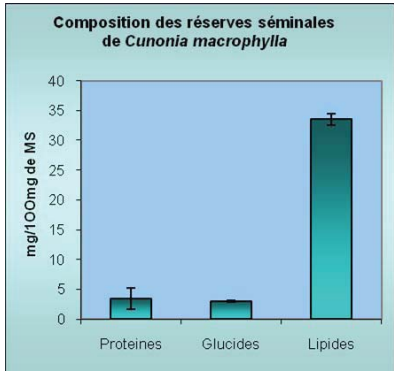
3,13 ± 1,62 mg/100mg de matière fraîche
3,87 ± 2,00 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

2,72 ± 0,16 mg/100mg de matière fraîche
3,36 ± 0,20 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

30,43 ± 0,88 mg/100mg de matière fraîche
37,65 ± 0,99 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids	(+/- SE)
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	11,77	0,397
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadecanoic	Palmitoleic	0,27	0,011
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	3,40	0,089
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	15,04	0,406
C 18:1Δ11	cis-11-Octadecanoic	Vaccenic	2,06	0,053
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	65,23	1,942
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	0,44	0,010
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,25	0,001
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic		0,06	0,007
C 22:0	Docosanoic	Behenic	0,14	0,007
Total of identified Fatty acids in seeds			98,67	2,847

Il est à noter que 7 acides gras minoritaires puisque ne représentant que 1,33% des acides gras totaux n'ont pu être identifiés.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

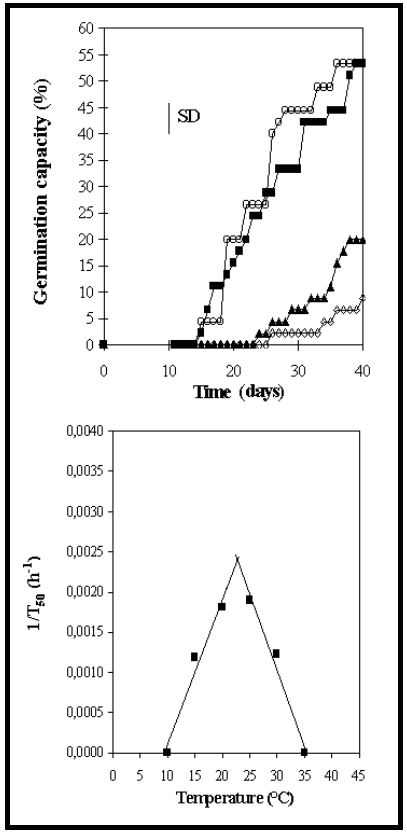
- Graine en poudre : 9,16 % (+/- 0,28).

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Viabilité du lot de semence

Ce taux de viabilité dépend du lot considéré, mais se situe à des valeurs proches de 90%.

Germination (Fogliani *et al.*, 2004)

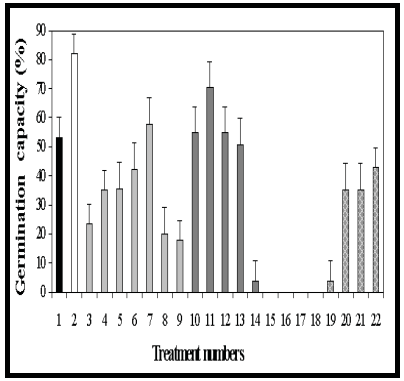


Effets de la température sur la germination de *C. macrophylla*

En haut : Pourcentages de germination cumulées en fonction du temps à 15°C (▲), 20°C (■), 25°C (○), 30°C ( ), 35°C (✳). En bas : Effet de la température sur le taux de germination exprimé sous forme de l'inverse du temps nécessaire pour l'obtention de 50% de germination (T50).

La température optimale de germination a été déterminée pour cette espèce à 22-23°C avec un temps de latence de 14 jours. Pour des températures plus basses ou plus élevées, ce temps de latence est allongé et les taux de germination plus faibles.

La recherche des moyens d'optimiser cette germination révèle que plusieurs prétraitements sont efficaces, à savoir la scarification mécanique (81%) ou des bains d'eau chaude pour lesquels à 40°C, on obtient un taux de germination approximatif de 70%, contre 52% sans prétraitement.



Capacité maximale de germination des semences de *C. macrophylla* à 25°C en réponse à différents pré-traitements.

Traitements : 1 = Témoin. 2 = Scarification mécanique. 3 = Froid à 4°C, 2j. 4 = Froid à 4°C, 4j. 5 = Froid à 4°C, 7j. 6 = Froid à 4°C, 10j. 7 = Froid à 4°C, 14j. 8 = Froid à 4°C, 21j. 9 = Froid à 4°C, 28j. 10 = Eau chaude à 30°C. 11 = Eau chaude à 40°C. 12 = Eau chaude à 50°C. 13 = Eau chaude à 60°C. 14 = Eau chaude à 70°C. 15 = Eau chaude à 80°C. 16 = Eau chaude à 90°C. 17 = Eau chaude à 100°C. 18 = Acide sulfurique pur, 5 min. 19 = Acide sulfurique dilué au 1/2, 5 min. 20 = Acide sulfurique dilué au 1/4, 5 min. 21 = Acide sulfurique dilué au 1/8, 5 min. 22 = Acide sulfurique dilué au 1/16, 5 min.

Cette méthode est simple d'application et ne nécessite pas d'importants investissements financiers : dans de l'eau préalablement chauffée à 40°C, plonger les semences scarifiées, et stopper le chauffage des bains immédiatement après leur immersion. Laisser refroidir les semences dans l'eau pendant 12h et semer les directement.

Semis

➢ **Pour le semis en milieu naturel dégradé**, la meilleure période pour l'optimisation de la germination des semences semble être de novembre à février, période chaude et à forte pluviométrie, avec une amplitude de température jour/nuit atteignant +/- 20°C. Cependant, il faut être extrêmement prudent à ne pas semer avant un passage orageux violent, ce qui favorise le lessivage des sols, et donc la perte des semences, et diminue les chances de survie des jeunes plantules germées.

➢ **Pour le semis en pépinière**, il pourrait être très intéressant que les semis soient effectués à températures contrôlées (dans le cas présent, à 23°C), soit par l'utilisation d'une serre thermorégulée (coût excessif), soit par l'utilisation d'une étuve réfrigérée.

Pour cette proposition, la méthode est très simple : dans un bac, disposer sur un substrat qui présente une bonne capacité de rétention (vermiculite par exemple) les semences après prétraitement (voir plus haut).

Arroser abondamment, et recouvrir le bac de film plastique. Mettre à l'étuve préalablement réglée à 23°C, et ne pas hésiter à rajouter de l'eau si cela semble nécessaire. Replanter ensuite les jeunes plantules germées sur un substrat riche type terreau à condition qu'il soit mélangé à un substrat qui permet une bonne aération racinaire.

Si le prétraitement a été efficace, le taux de germination observé approchera les 70%.

La croissance des plants est relativement lente, 12 cm après 18 mois sur le substrat précédemment cité.

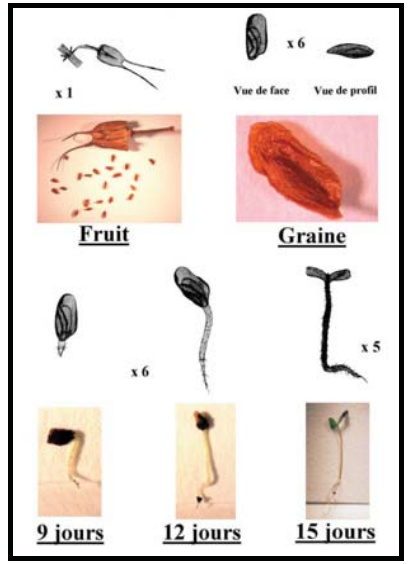
Jeune plant de de *Cunonia macrophylla* à 3 mois

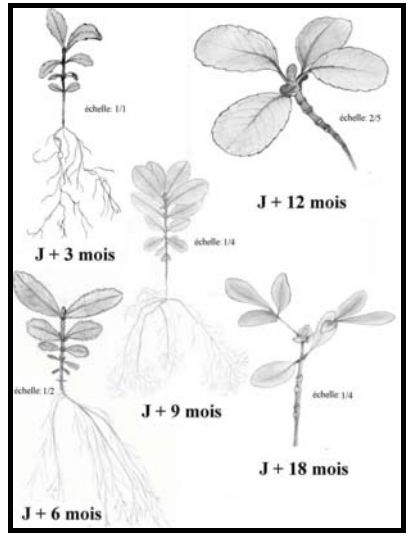
Plant de de *Cunonia macrophylla* à 6 mois

Plant de de *Cunonia macrophylla* à 9 mois

Plant de de *Cunonia macrophylla à* 12 mois

Plant de de *Cunonia macrophylla* à 18 mois





Fiche descriptive de l'espèce du fruit à la plantule (Fogliani *et al.*, en préparation)

Famille

Hippocrateaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle Calédonie 4 espèces, toutes endémiques et appartenant au genre *Dicarpellum*.

Description de l'individu adulte

- Arbuste de 2 à 5 mètres.

- Description des feuilles

Feuilles alternes courtement pétiolées, d'environ 5-13 cm de longueur et 2-5 cm de large.
Elles ont une forme arrondie, acuminée ou émarginée au sommet, les nervures sont saillantes. Présence de petites stipules.

Feuilles de *Dicarpellum baillonianum* (©D. & I. Létocart)

- Description de la fleur

Les fleurs sont unisexuées et peuvent être seules ou sur des inflorescences irrégulièrement ramifiées. Elles suivent une symétrie radiale (actinomorphes).

Elles se composent de 4-6 pétales et 2-5 sépales. Les fleurs mâles possèdent 2-3 étamines.
La couleur est plutôt variable verdâtre, rouge pale, jaunâtre ou encore jaune. Elles sont pédicellées.

- Description du fruit

Les fruits en capsules obovoïdes mesurent 15-20 × 11-13mm. Elles ont deux loges contenant 1 ou 2 graines entourées d'un arille charnu.

Fruit vert de *Dicarpellum baillonianum* (©LIVE/UNC)

Habitat

Elle se développe en sous bois de forêts denses humides. Elle s'installe sur des sols plus ou moins profonds avec substrats ultramafiques ou sédimentaires.

Distribution géographique

On la retrouve sur deux régions disjointes de la Grande terre, une au nord est de Touho à Ouégoa et l'autre au sud ouest. On peut la retrouver à des altitudes comprises entre 75 et 1200 mètres

Distribution géographique de *Dicarpellum baillonianum*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- Fructification principalement de novembre à décembre mais aussi en avril.

Fruits de *Dicarpellum baillonianum* (©D. & I. Létocart)

Données quantitatives

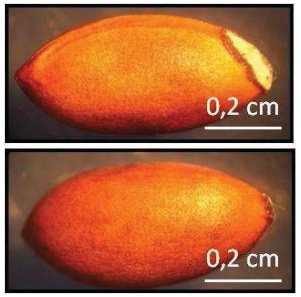
Poids de 100 graines : 4,87 (± 0,3) g,
soit 20 (± 2) graines/g.

Description de la semence

1/ Structure externe :

La taille des semences est de 0,6-0,8 x 0,2-0,3 cm pour 1,5 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ovale, avec une extrémité plus rectiligne que l'autre de couleur blanche (coté de la graine d'où l'embryon sort). Elle présente également une face plus bombée.

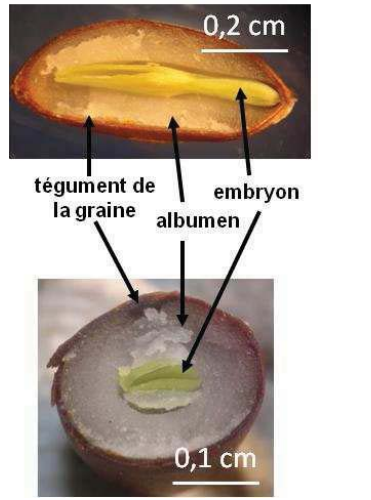
La graine de couleur marron clair a un aspect lisse.



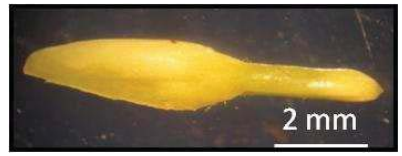
Face dorsale (en haut) et ventrale (en bas) d'une graine de *Dicarpellum baillonianum* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

Graine de type albuminée (observation d'un embryon de couleur verte placé au milieu du tissu nourricier).



Coupe longitudinale (en haut) et transversale (en bas) d'une graine de *Dicarpellum baillonianum* (©LIVE/UNC)



Vue de l'embryon d'une graine de *Dicarpellum baillonianum* (©LIVE/UNC)

La dissection mets en évidence une couche tégumentaire fine, de couleur marron.
L'embryon est axile, c'est-à-dire que celui-ci est placé dans l'axe de la graine, la radicule étant dirigée vers la base de la graine. Celle-ci est caractérisée par les restes visibles du point d'attache du fruit au niveau de l'infrutescence.
Le tissu nourricier de couleur blanchâtre remplit les trois quarts de l'espace.

Dodonaea viscosa

Famille

Sapindaceae

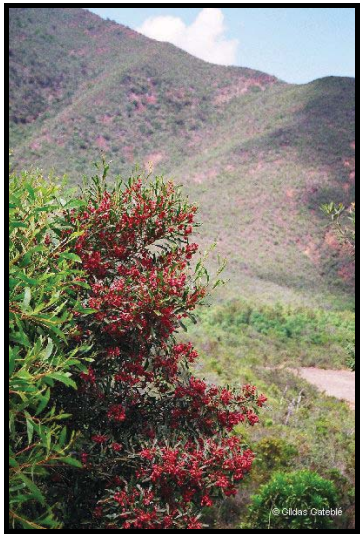
Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie, 67 espèces dont **60 endémiques**.
Le genre *Dodonaea* compte deux espèces en Nouvelle-Calédonie, toutes deux indigènes.

D. viscosa est une espèce pantropicale.

Description de l'individu adulte

- Arbuste ou petit arbre de 1,5 - 5 m de hauteur à écorce grise et légèrement rugueuse.



Pied adulte de *Dodonaea viscosa in situ*
(©G. Gateblé)

- Description des feuilles

Feuilles simples, alternes, à court pétiole, oblongues à lancéolées, vert brillant de 2x10-15 cm. La nervation très dense est réticulée.

Feuillage et fleurs de *Dodonaea viscosa*
(©G. Gateblé)

- Description de la fleur

Fleurs petites, de couleur blanche crème à jaune orange.

Fleurs de *Dodonaea viscosa*
(©B. Suprin)

- Description du fruit

Fruits en capsules à 3-4 ailes, rouges bruns, pourpres, jaunes ou roses, marrons à maturité.

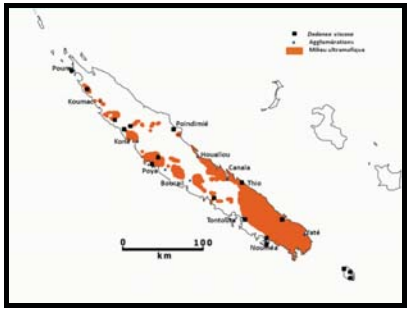
Fruits murs de *Dodonaea viscosa*
(©D. & I. Létocart)

Habitat

Cette espèce vit aussi bien en forêt sclérophylle qu'en fourrés secondaires ou encore sur les maquis miniers.

Distribution géographique

C'est un arbuste ayant une teneur élevée en azote dans ses tissus foliaires que l'on retrouve assez aisément sur toute la grande terre entre 0 et 500 mètres d'altitude.



Distribution géographique de *Dodonaea viscosa*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2004.

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle d'Attims :

Technique et conseil de récolte

Les fruits doivent être collectés à maturité avant éclatement.

La période de collecte s'étale d'août à novembre.

Extraction et conditionnement des graines

Les fruits sont mis à sécher au sec et à la lumière ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 370 (± 6,80) mg,
soit environ 270 (± 5) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (à 4°C au froid sec)

Description de la semence

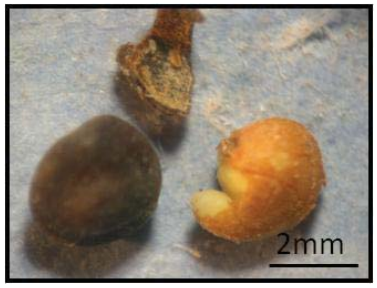
1/ Structure externe :

Graines dures, noires et luisantes, mesurant 0,2-0,3 x 0,25 cm.

Graines entières de *Dodonaea viscosa* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La dissection des semences révèle la présence d'une couche tégumentaire épaisse limitant l'accessibilité à l'eau et d'un embryon volumineux blanchâtre entouré d'un tissu fin jaunâtre.



Graine disséquée de *Dodonaea viscosa* (©LIVE/UNC)

L'observation de l'embryon extrait montre bien le positionnement de la radicule et de la zone cotylédonaire :

Embryon extrait de la graine de *Dodonaea viscosa* (©LIVE/UNC)

Il est important de noter que cet embryon occupe tout l'espace et qu'il n'y a pas d'albumen.

Il s'agit donc d'une graine de type exalbuminé.

Par ailleurs, une coupe transversale révèle un repliement des tissus, on parle d'ovule anatrope.

Coupe transversale de la graine de *Dodonaea viscosa* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé 16.2004 :

- *Composition brute en protéines*

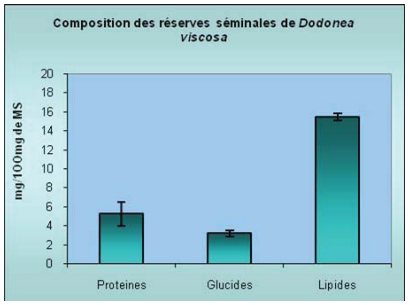
4,66 ± 1,10 mg/100mg de matière fraîche
5,26 ± 1,24 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

2,84 ± 0,32 mg/100mg de matière fraîche
3,20 ± 0,36 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

13,71 ± 0,35 mg/100mg de matière fraîche
15,47 ± 0,39 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	9,07
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	2,77
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	16,53
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	0,37
C 18:3Δ6,9,12	cis,cis,cis-6,9,12-Octadecatrienoic	γ-Linolenic	1,37
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	2,99
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic	Eicosenoic	0,03
C 22:0	Docosanoic	Behenic	1,68
C 24:0	Tetracosanoic	Lignoceric	0,33
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			35,13

Il est à noter que seul près de 35% des acides gras ont été identifié. En effet, un pic qui représente près de 60% et des minoritaires représentant 5%, n'ont pu être identifiés. Une étude est en cours.

Degré d'humidité des graines

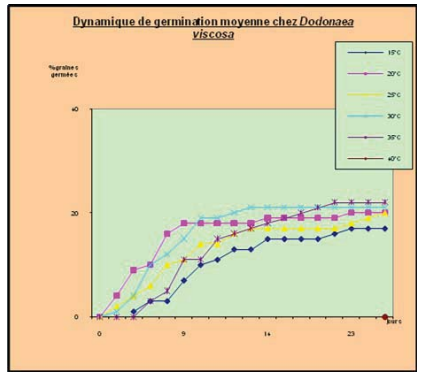
Taux d'hydratation de la graine :

- Graine en poudre : 11,36 % (± 0.45).

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Germination

Une étude de l'influence de la température sur la germination des graines scarifiées de cette espèce a été réalisée. Elle révèle que la meilleure température est de 35°C avec des taux de germination proche de 20%.



Entre 15 et 35°C, le taux de germination de *Dodonaea viscosa* est très homogène. A ces niveaux de températures, les graines germent à partir du 5ème jour et le maximum est atteint le 28ème jour. Aucune germination n'a été observée au-delà de 40 jours à 40°C.

Pour améliorer ces taux de germination, une scarification semble nécessaire pour permettre une meilleure accessibilité à l'eau pour l'embryon. On peut penser que dans l'état naturel, cette scarification a lieu soit mécaniquement soit par l'intermédiaire d'animaux.

Jeune plantule de *Dodonaea viscosa* (©LIVE/UNC)

Elaeocarpus kaalensis

Famille

Elaeocarpaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 46 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 43 sont endémiques, réparties sur 3 genres. Le genre *Elaeocarpus* compte 31 espèces dont 29 sont endémiques de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbuste multicaule de 1 à 2 mètres.

- Description des feuilles
  Feuilles alternes de 8-17 x 3-7 cm groupées au sommet des rameaux. Elles sont de forme elliptique, arrondies au sommet, en coin à la base, plutôt épaisses, nervures saillantes. Pétioles de 2 à 4 cm.

Feuillage d'*Elaeocarpus kaalensis* (©D. & I. Létocart)

- Description de la fleur
  Les fleurs sont sur des inflorescences pendantes. L'aisselle des feuilles ou cicatrices foliaires, est de couleur rouge foncé, pourpre. Etamines assez nombreuses (trentaine).
  Les pétales sont libres de couleur cramoisies, les sépales sont rosâtres. Les boutons floraux sont verts pales.

- Description du fruit
  Fruits en drupes ellipsoïdes à mésocarpe charnu, mesurant 3,5 x 2,5 cm. Les drupes son rouge sombre à violacé à maturité.
  Le noyau est assez gros, ligneux à surface ridée, pointu au sommet, aplati sur les cotés.

Fruits d'*Elaeocarpus kaalensis* (©D. & I. Létocart)

Habitat

Elle se développe dans le maquis arbustif. Elle s'installe préférentiellement sur des terrains issus de roches serpentiniques, et sur des substrats ultramafiques (sols plus ou moins érodés).

Distribution géographique

.

Assez rare, présente surtout dans le Nord Ouest de la « Grande Terre », et aussi au Sud Ouest de la Tontouta, depuis 100 mètres et jusqu'à 1000 mètres d'altitude.

Distribution géographique d'*Elaeocarpus kaalensis*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- Floraison et fructification de mars à octobre.

Description de la semence

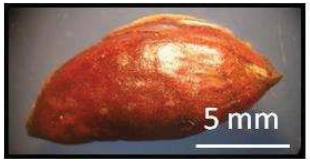
1/ Structure du fruit :

Dans un fruit se retrouve une graine.

Fruits d'*Elaeocarpus kaalensis* (©LIVE/UNC)

2/ Structure externe :

La taille des semences est de 1,6-1,8 x 0,5-0,7 cm pour 0,6 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme d'amande, avec une extrémité plus rectiligne et pointue que l'autre.
Elle est de couleur marron clair à foncé. Elle a une tâche de couleur clair sur la face moins bombée.

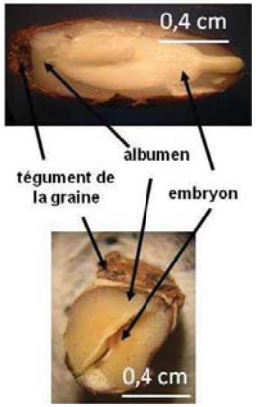


Face dorsale d'une graine d'*Elaeocarpus kaalensis* (©LIVE/UNC)

Face ventrale d'une graine d'*Elaeocarpus kaalensis* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine de type albuminée (observation d'un embryon opaque placé au milieu du tissu nourricier).



Coupe longitudinale (en haut) et transversale (en bas) d'*Elaeocarpus kaalensis* (©LIVE/UNC)

La dissection montre une couche tégumentaire très fine.
L'embryon de couleur plus clair est disposé en « lamelle » au centre du tissu nourricier. L'albumen jaunâtre occupe les trois quarts de l'espace.

Gahnia aspera

Famille

Cyperaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie, 98 espèces réparties sur 25 genres dont 35 endémiques.

Sur les massifs ultramafiques, les Cypéracées constituent la principale composante de la flore herbacée.

Le genre compte en Nouvelle-Calédonie 5 espèces dont 3 sont endémiques. *G.aspera* fait partie des espèces autochtones.

Description de l'individu adulte

- Plante herbacée se développant en touffes pouvant atteindre 1 mètre de hauteur.

Vue d'ensemble de *Gahnia aspera* (©JL. Ruiz)

- Description des feuilles

Feuilles longues, plates, et rugueuses au toucher.

- Description du fruit

Les fruits sont secs indéhiscents de type achène, orange à rouge foncé à noirs à maturité. La fructification s'effectue pendant la période de mai.

Fruits de *Gahnia aspera* sur leur hampe florale (©G. Gateblé)

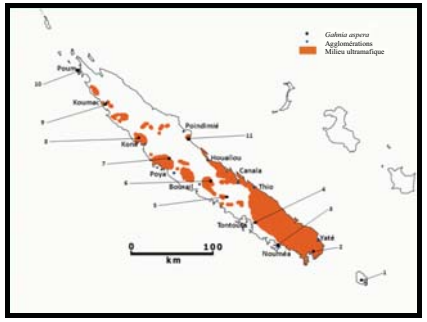
Epi non éclaté de *Gahnia aspera* (©JL. Ruiz)

Habitat

L'espèce est présente au niveau du maquis ligno-herbacé, sur des substrats ferralitiques, ultramafiques.

Distribution géographique

Largement répandue entre 0 mètre et 500 mètres d'altitude.



Distribution géographique de *Gahnia aspera*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

L'idéal est la récolte de l'ensemble de la hampe florale lorsque les graines sont de couleur rouge foncé .

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec sous des néons ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 1,09 (± 0,03) g,
soit environ 91 (± 3) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante le taux de germination chute plus rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

- Le fruit :

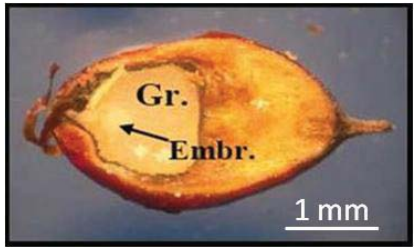
Le fruit est un achène ovoïde dont la taille varie de 3-4 x 3-6 mm. Matures, ils sont de couleur rouge orange à marron foncé. Le fruit est brillant. Un petit poil surplombe le fruit de 2 à 5 mm de long. La zone d'insertion de ce dernier est noirâtre. (on ne le voit pas sur la photo). Les graines, une fois isolées, mesurent environ 1-3 x 1,5-3 mm. Comme le fruit, la graine est ovoïde et de couleur marron.

Fruit de *Gahnia aspera* (©LIVE/UNC)

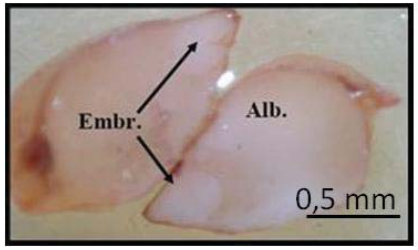
2/ Structure interne

La semence est contenue dans un fruit dont le péricarpe est très épais laissant présager de la difficulté de l'accessibilité à l'eau pour l'embryon.

La coupe longitudinale montre la présence d'un albumen (Alb.) et d'un embryon (Embr.) bien différencié. L'embryon mesure environ 1mm et est situé à l'une des extrémités de la graine, vraisemblablement du coté correspondant au micropyle de la semence.

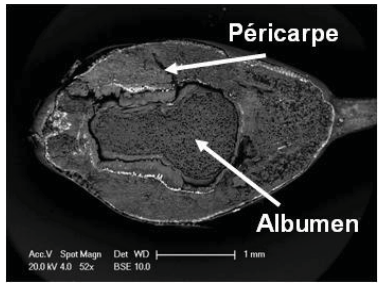


Fruit de *Gahnia aspera* coupé longitudinalement (©LIVE/UNC)



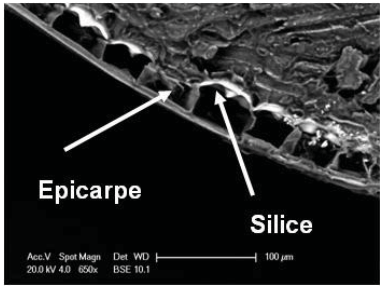
Graine de *Gahnia aspera* coupée longitudinalement (©LIVE/UNC)

3/ Ultrastructure



Achène de *Gahnia aspera* coupé longitudinalement observé au MEB (©LIVE/UNC)

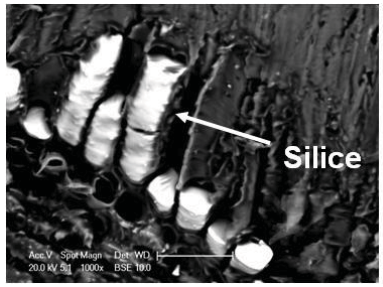
L'analyse au microscope électronique à balayage (MEB) de l'achène de *Gahnia aspera* montre la présence d'un péricarpe épais et d'un albumen volumineux. On remarque aussi la présence de deux halos de structure imprégnée de silice dans la partie du péricarpe la plus externe ainsi que celle la plus interne.



Assise cellulaire de l'ectocarpe de *Gahnia aspera* au MEB (©LIVE/UNC)

Une observation approfondie de l'assise cellulaire de l'épicarpe montre la présence de structure siliceuse imprégnant la paroi interne des cellules ainsi qu'une structure en forme de doigt pénétrant la lumière des cellules.

L'observation de la partie interne du péricarpe montre des vaisseaux remplis de cette matière siliceuse qui doit jouer sans aucun doute un rôle dans la dureté du péricarpe :



Vaisseaux conducteurs de l'endocarpe de *Gahnia aspera* au MEB (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

13,56 ± 1,76 mg/100mg de matière fraîche
14,63 ± 1,90 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

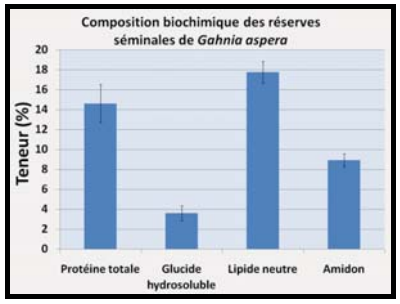
3,33 ± 0,7 mg/100mg de matière fraîche
3,59 ± 0,76 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

16,47 ± 1,02 mg/100mg de matière fraîche
17,77 ± 1,10 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en amidon*

8,26 ± 0,60 mg/100mg de matière fraîche
8,92 ± 0,65 mg/100mg de matière sèche



L'analyse biochimique montre une prédominance de la fraction lipidique neutre suivie de la fraction protéine. *Gahnia aspera* est donc une semence oléagineuse.

Taux d'hydratation du fruit :

- Fruit : 7,29 %

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

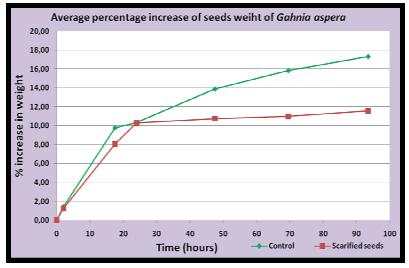
Viabilité du lot de semence

Le taux de viabilité dépend du lot, il est de 44% pour le lot considéré.

La viabilité des graines de cette espèce est très variable d'un lot à l'autre du fait de collectes certainement mal placées dans le temps car les fruits de cette espèce après avoir atteint leur maturité « visuelle » (rouge foncé) restent plusieurs mois accrochés sur la hampe florale. La connaissance du degré de maturité réelle de la graine reste difficile. Il faudrait pour cela déterminer des marqueurs moléculaires de cette maturité qui pourrait faire l'objet d'étude ultérieure. Dans tous les cas, un test par flottaison peut s'avérer utile quant à l'optimisation de la qualité des lots de semences de *Gahnia aspera*.
En effet, un test par flottaison s'avère efficace afin de séparer les semences non viables des viables et ainsi améliorer la qualité des lots de semences utilisés lors des opérations de restauration écologique.

	Pourcentage de graine viable	Pourcentage de graine non viable	Total
Graine coulée	44% (76%)	14% (24%)	58%
Graine flottante	0% (0%)	42% (100%)	42%
Lot initial	44%	56%	100%

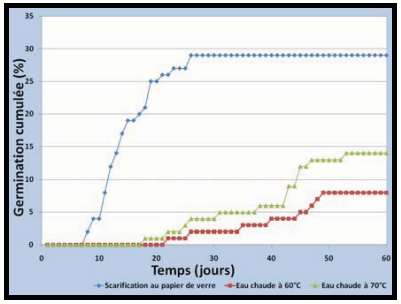
Prise d'eau



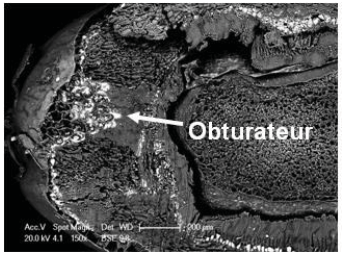
Une étude concernant la prise d'eau réalisée sur des semences de *Gahnia aspera* non traitées et des semences traitées au papier de verre montre une faculté d'absorption de l'eau des graines témoins importante. Ainsi, les semences de *Gahnia aspera* ne développent aucune imperméabilité de leur tissu (péricarpe, tégument…).

Germination

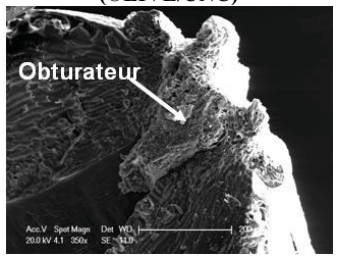
Une étude sur la germination a montré que le meilleur prétraitement susceptible d'améliorer et d'optimiser la germination des semences de *G. aspera* est la scarification entière des semences via un papier de verre.



Une observation réalisée au MEB d'une semence non traitée et d'une semence de *Gahnia aspera* traitée dans un bain d'eau chaude à 70°C a permis de mettre en évidence la présence d'une structure appelée « obturateur ». Ce dernier étant fragilisé après passage au bain d'eau chaude, et étant positionné en vis-à-vis de l'embryon et de la radicule, la déstructuration et la fragilisation de ce dernier permettraient à la radicule de percer à ce niveau le péricarpe pour permettre la germination puis la croissance de la plantule.



Coupe transversale d'un achène de *G. aspera* non traité observée au MEB (©LIVE/UNC)

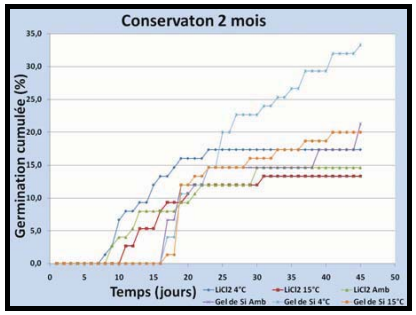


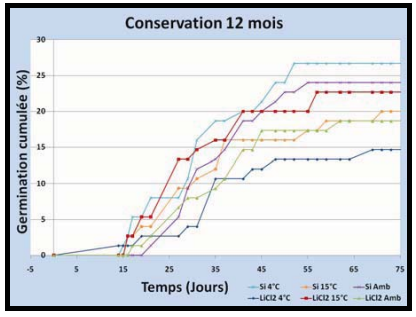
Coupe transversale d'un achène de *G. aspera* traité à l'eau chaude à 70°C observée au MEB (©LIVE/UNC)

Les résultats des analyses réalisées via la prise d'eau, la germination, les observations effectuées à l'aide du microscope électronique à balayage tendent à définir la dormance des semences de *Gahnia aspera* comme étant une dormance induite par leur péricarpe. Baskin et Baskin (2004) classent ces semences comme ayant une dormance physiologique peu profonde induite par le péricarpe de la semence.

Conservation

L'étude de l'effet de la température de conservation (4°C, 15°C, Ambiante) et de différents taux d'humidité a été réalisée. Les résultats montrent qu'une tendance à ce que les semences conservées à 4°C germent mieux que les semences conservées à 15°C ou à température ambiante.





La même étude montre également que les semences germent plus aisément suite à une conservation avec des taux d'humidité moindre (gel de silice 5%) comparé au taux d'humidité de 11-12% (chlorure de lithium).

Famille

Rutaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 85 espèces, dont 78 sont endémiques. 21 genres se trouvent en Nouvelle-Calédonie, dont 8 genres sont endémiques.

Parmi le genre *Geijera*, on trouve 4 espèces autochtones dont 3 sont endémiques.

Les fleurs des Rutaceae sont régulières, les pièces florales placées en cercle symétrique par rapport à l'axe. Les anthères s'ouvrent longitudinalement à maturité pour libérer le pollen. L'ovaire a plusieurs loges, et est placé au-dessus du plan d'insertion des autres pièces florales. L'ovaire est supère.

Description de l'individu adulte

- Arbres d'environ 6 mètres.
- Description des feuilles

Feuilles petites, lancéolées, vert foncé et brillant au dessus, et vert clair en dessous. Feuilles très odorantes lorsqu'on les froisse.

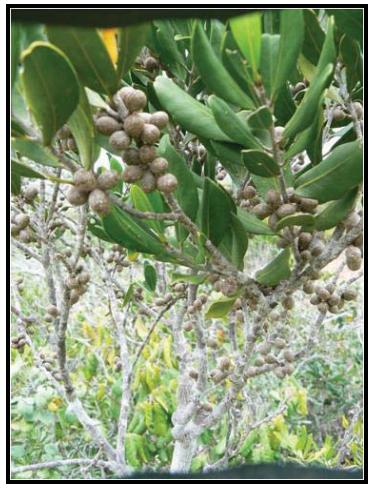
Plant de *G. cauliflora* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

Fleur blanche, très petite. Cauliflorie importante. Fleur verte légèrement odorante.

- Description du fruit

Fruits à 5 articles en étoiles.



Rameau fructifère de *G. cauliflora* (©LIVE/UNC)

Habitat

On retrouve l'espèce au niveau de la forêt sclérophylle, et au niveau du maquis.

Distribution géographique

Espèce présente à 20 m d'altitude.

Distribution géographique de *Geijera cauliflora*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Technique et conseil de récolte

Les fruits secs encore accrochés à l'arbre sont récoltés directement.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec à la lumière ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 6,66 (± 0,06) g,
soit environ 15 (± 1) graines/g.

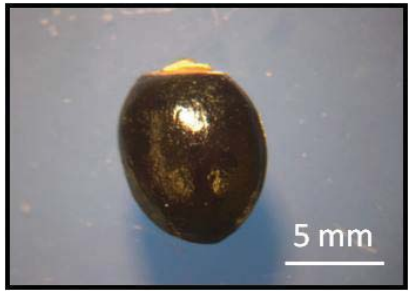
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante le taux de germination chute rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

La graine de *G. cauliflora* est de forme ovale avec une taille variant de 5-9 x 5-6 mm. Elle présente une collerette, au niveau duquel la graine est aplatie. Elle est de couleur noire. Sa surface est brillante, lisse et relativement grasse.

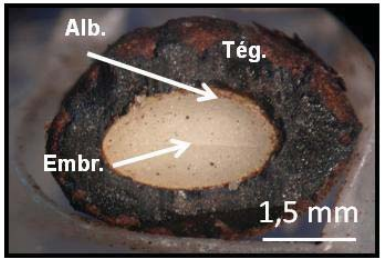


Graines de *G. cauliflora* (©LIVE/UNC)

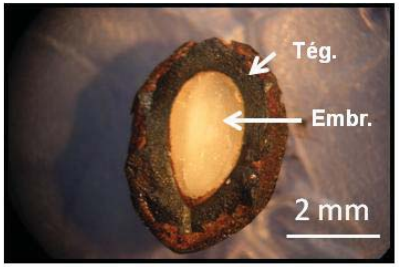
2/ Structure interne

En ce qui concerne la structure interne, l'observation des coupes à la loupe binoculaire montre la présence d'un embryon (Embr.) volumineux au sein d'un albumen (Alb.).

Les coupes transversales montrent en effet la présence bien visible de 2 cotylédons de taille importante. Le tégument (Tég.) de la semence présente une épaisseur importante



Coupe transversale de la graine de *G. cauliflora* (©LIVE/UNC)



Coupe longitudinale de la graine *G. cauliflora* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

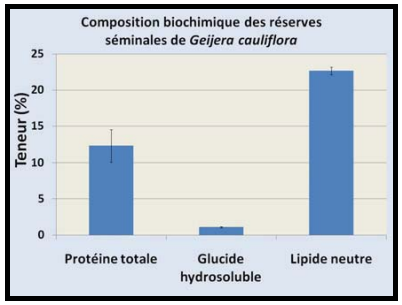
10,73 ± 1,93 mg/100mg de matière fraîche
12,34 ± 2,22 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

0,96 ± 0,07 mg/100mg de matière fraîche
1,11 ± 0,08 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

19,72 ± 0,45 mg/100mg de matière fraîche
22,68 ± 0,52 mg/100mg de matière sèche



La composition biochimique des réserves séminales de *Geijera cauliflora* est essentiellement lipidique. Il s'agit d'une semence oléagineuse. La fraction protéique représente quant à elle 12,34% et la fraction glucidique hydrosoluble 1,11%.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine :
  13,65 % (± 0.29)

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe ou intermédiaire.

Viabilité du lot de semence

Le taux de viabilité du lot est de 93%.

Germination

L'étude de l'influence de différents traitements a été réalisée. Ces traitements sont:
- Eau chaude : 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C
- Eau bouillante : 1, 2, 5 min
- H_2SO_4 98% dilué au ¼ : 1, 5 ,10 min
- Scarification au papier de verre
- Eau fumigée : 6, 12, 24h après scarification au papier de verre.
- Pourrissement pendant 2 mois dans de l'eau à l'air libre et à température ambiante

Aucune germination significative n'a été notée après 40 jours d'observation.

Geissois hirsuta

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces, **toutes endémiques**, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbre de 8 à 10 mètres.

- Description des feuilles

Feuilles épaisses, opposées, composées palmées, trifoliolées, pétiole net de 12-14 cm. Folioles duveteuses pétiolulées de 32-35 x 14-16 cm, à marge dentée, à pétiolule de 2 cm pour les latérales et de 3-4 cm pour la terminale. Folioles latérales à anisophyllie marquée. Stipule épaisse hirsute fauve de 3 x 4 cm.

- Description de la fleur

Inflorescence en grappe de couleur rouge de 15-20 cm, cauliflore, totalement hirsute. Fleurs pédicellées (0.7-0.9 cm), à 4 sépales, pas de pétales, à ovaire supère hirsute, à deux styles persistant sur le fruit.

Vue d'un rameau avec inflorescences de *G. hirsuta* (©J.M. Veillon)

- Description du fruit

Le fruit est une capsule cylindrique vert quand il est jeune et tournant au rouge puis finalement brun à maturité, duveteux à tous les stades, à déhiscence septicide.

Vue d'un rameau avec infrutescence de *G. hirsuta* (©M. Litaudon)

L'infrutescence mesure de 15 à 20 cm et est constituée de 40 à 50 fruits pédicellés (0.7-0.9 cm) mesurant de 1.1 à 1.3 cm de long.

Infrutescence de *G. hirsuta* (©LIVE/UNC)

Fruit mature de *G. hirsuta* avec deux semences (©LIVE/UNC)

Habitat

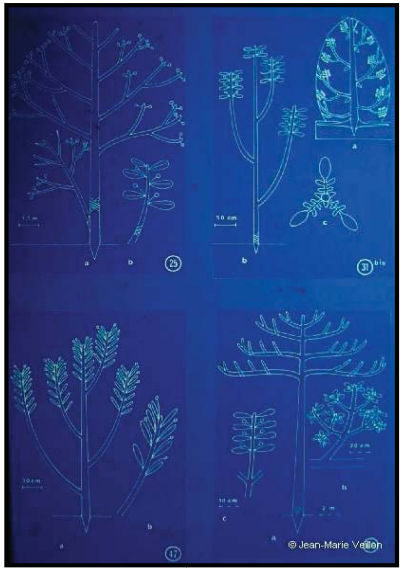
On retrouve l'espèce surtout en forêt dense humide et dans les fourrés secondaires (zones dégradées).

Distribution géographique

Distribution géographique de *Geissois hirsuta*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle d'Attims, ce qui signifie que les axes primaires et secondaires présentent une croissance monopodiale indéfinie.



Technique et conseil de récolte

La récolte des semences doit intervenir seulement lorsque les fruits ont atteint le stade de maturité physiologique mais avant qu'ils ne soient ouverts, laissant échapper les graines ailées. Les infrutescences doivent donc être placées dans un sachet pour la collecte.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 91 (± 2) mg,
soit environ 1100 (± 25) graines/g.

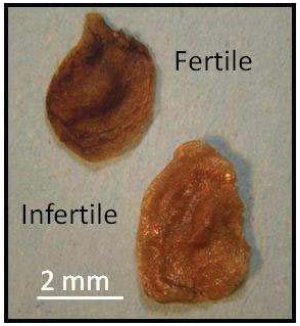
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et au sec plusieurs mois

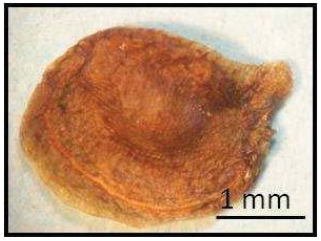
Description de la semence

1/ Structure externe :

Les graines sont marrons claires. Elles mesurent environ 4 mm de long, 2 mm de large et 0,5 mm d'épaisseur. Contrairement à la plupart des graines d'espèces du genre *Geissois*, celle-ci présente une partie ailée peu importante. Par contre, il existe une partie de forme ovoïde bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers.



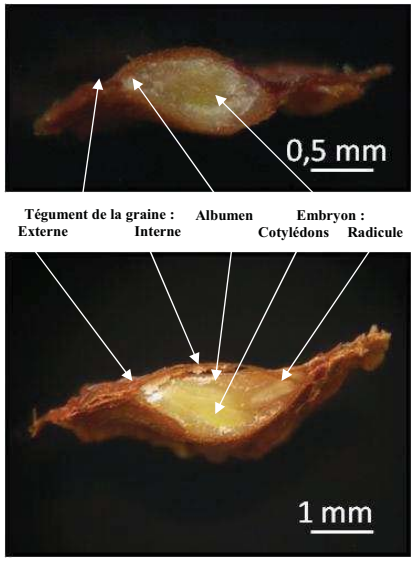
Graines de *G. hirsuta* d'aspect fertile et infertile (©LIVE/UNC)



Graine de *G. hirsuta* avec son tégument peu ailé (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La semence présente une première couche tégumentaire externe relativement fine, et une couche tégumentaire interne.
Les coupes permettent d'observer dans la partie bombée un épais tissu blanc opaque (albumen) et l'embryon, la graine est donc de type albuminée.
D'autre part, il est aisé de distinguer sur la coupe longitudinale les deux cotylédons ainsi que la radicule de l'embryon bien différenciés.



Coupe transversale (en haut) et longitudinale (en bas) de *G. hirsuta* observées à la loupe binoculaire (©LIVE/UNC)

Viabilité du lot de semence

Le seul lot étudié référencé M3 présentait un taux faible de 10% de viabilité.

Remarque : Aucune autre étude spécifique n'a été à ce jour menée sur cette espèce faute de quantité suffisante.

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces (certaines, nouvelles, sont en cours de descriptions), toutes endémiques, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbre de 3 à 4 mètres.
- Description des feuilles

Feuilles opposées, composées palmées à 3 folioles, pétiole net de 5 cm. Folioles pétiolulées de 12-15 x 4-5 cm, à marge entière, à pétiolule de 2 cm. Stipule terminale de 2.5 x 2.5 cm, glabre.

- Description de la fleur

Inflorescence de 18-20 cm, de couleur rouge, cauliflore, à pédoncule de 4 cm. Fleurs à 4 sépales rouges, pas de pétales, 12 étamines, ovaire glabre à deux styles persistants sur le fruit.

Vue d'un rameau avec inflorescences de *Geissois magnifica* (©D. & I. Letocart)

- Description du fruit

Le fruit est une capsule cylindrique, vert quand il est jeune tournant au rouge puis finalement brun à maturité, à déhiscence septicide.

Distribution géographique

La répatition des espèces de *Geissois magnifica* est restreinte à la zone centre-est où l'on retrouve principalement des individus évoluant sur sol issu de roche ultramafique.

Distribution géographique de *Geissois magnifica*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

La récolte des semences doit intervenir seulement lorsque les fruits ont atteint le stade de maturité physiologique mais avant qu'ils ne soient ouverts, laissant échapper les graines ailées. Les infrutescences doivent donc être placées dans un sachet pour la collecte.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 91 (± 2) mg,
soit environ 1100 (± 75) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et au sec pendant plusieurs mois

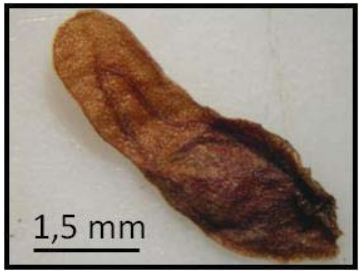
Description de la semence

1/ Structure externe :

La semence présente une forme grossièrement ovoïde, sa taille varie de 6-7 x 1,8-2 mm.

La graine présente une partie ailée importante, plate (rôle dans la dissémination par le vent) de couleur marron clair (3,5-4 x 1,5-1,8 mm) et une partie située à l'autre extrémité de la semence, de forme ovale bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers de couleur marron plus foncé (2,5-3 x 1,8-2 mm).

Les graines sont d'un marron plus foncé que celui des graines de *G. montana* mais plus clair que celles de *G. pruinosa*.



Graine entière de *Geissois magnifica* (©LIVE/UNC)

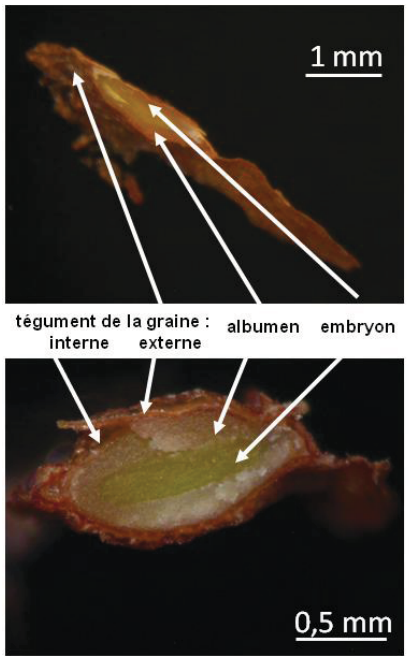
Graines fertile et non fertile de *Geissois magnifica* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La semence présente une première couche tégumentaire externe relativement fine et une couche tégumentaire interne.

Les coupes permettent d'observer dans la partie bombée un épais tissu blanc opaque (tissu nourricier) ainsi que l'embryon, la graine est donc de type albuminé.

Sur la coupe transversale apparaissent les deux cotylédons bien distincts.



Coupes transversale (en bas) et longitudinale (en haut) de *Geissois magnifica* observée à la loupe binoculaire (©LIVE/UNC)

Remarque : Aucune autre étude spécifique n'a été à ce jour menée sur cette espèce faute de quantité suffisante.

Geissois montana

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces, **toutes endémiques**, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle-Calédonie contre 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbre de 3 à 5 mètres.
- Description des feuilles

Feuilles opposées, composées palmées, à 5 folioles, pétiole net de 7-9 cm. Deux folioles de 9-10 x 5-6 cm à pétiolule de 1-1,5 cm et 3 folioles de 13-15 x 7-8 cm à pétiolule de 2-3 cm, à marge entière, en coin à la base, à sommet en pointe. Stipule de 2 x 1.5 cm, à poils épars sur la face inférieure.

- Description de la fleur

Inflorescence de 8-9 cm en grappe rouge. Fleurs à 4 sépales glabres sur la face extérieure et velus sur la face intérieure, pas de pétales, 12 étamines, à ovaire glabre à style à deux branches.

- Description du fruit

Le fruit est une capsule cylindrique vert quand il est jeune tournant au rouge puis finalement brun à maturité, à déhiscence septicide.

Vue d'un rameau avec inflorescences de *Geissois montana* (©J.C. Bradford)

Habitat

On retrouve l'espèce surtout en forêt dense humide dans la partie centrale de la Nouvelle-Calédonie sur sol non ultrabasique.

Distribution géographique

Geissois montana est prioritairement présent dans le nord-est de la « Grande Terre ».

Distribution géographique de *Geissois montana*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

La récolte des semences doit intervenir seulement lorsque les fruits ont atteint le stade de maturité physiologique mais avant qu'ils ne soient ouverts, laissant échapper les graines ailées. Les infrutescences doivent donc être placées dans un sachet pour la collecte.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 110 (± 1,8) mg,
soit 910 (± 15) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et au sec pendant plusieurs mois

Description de la semence

1/ Structure externe :

La semence présente une forme grossièrement ovale, sa taille varie de 0,6-0,8 x 0,2-0,3 cm.

Comme *Geissois pruinosa*, la graine a une partie ailée importante et plate (rôle dans la dissémination par le vent) et une partie située à l'autre extrémité de la semence, de forme ovoïde bombée, logeant l'embryon et les tissus nourriciers.

Graines de *Geissois montana* d'aspect fertile (©LIVE/UNC)

La semence es de couleur marron clair (plus claire que *Geissois pruinosa*). Il est difficile pour *Geissois montana* de trier visuellement les graines d'aspect fertile et stérile en raison de la couleur homogène du lot de graines.

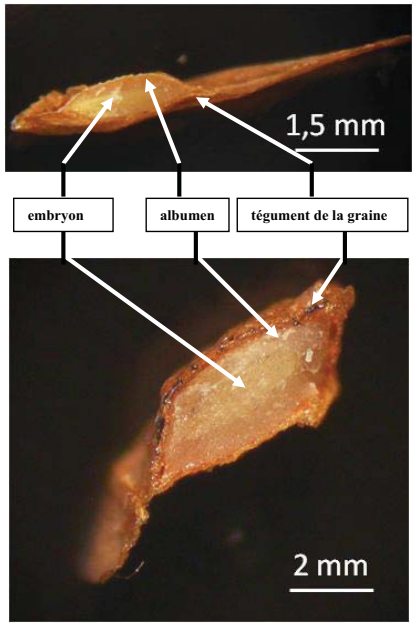
Graine de *Geissois montana* avec son tégument ailé (©LIVE/UNC)

Comparaison entre *G. pruinosa* à gauche et *G. montana* à droite (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La semence présente une première couche tégumentaire externe relativement fine, ornementée par une mosaïque marron clair, et une couche tégumentaire interne de couleur plus sombre et plus épaisse.

La coupe longitudinale permet d'observer dans la partie bombée un épais tissu blanc opaque (tissu nourricier) et un embryon de couleur plus jaunâtre, la graine est donc de type albuminé.



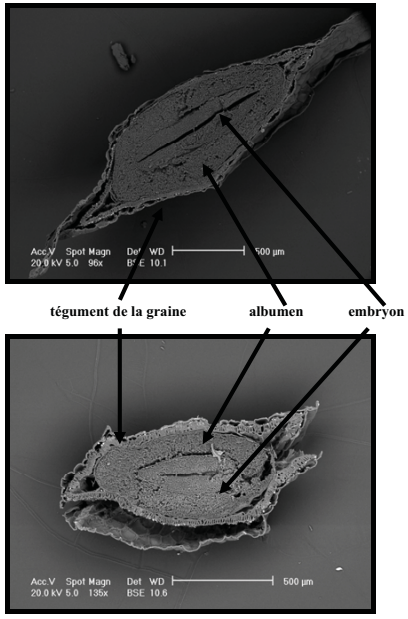
Coupes transversale (en bas) et longitudinale (en haut) de *Geissois montana* observées à la loupe binoculaire (©LIVE/UNC)

Remarque : Aucune autre étude spécifique n'a été à ce jour menée sur cette espèce faute de quantité suffisante.

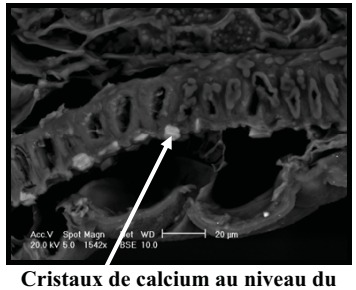
3/ Ultrastructure

- *Microscopie électronique à balayage en surface*

L'observation révèle la présence de cristaux d'oxalate de calcium (analyse non montré) au niveau du tégument de la graine et confirme la présence d'un albumen développé avec un embryon positionné longitudinalement.



Coupes longitudinale (en haut) et transversale (en bas) de *Geissois montana* (©LIVE/UNC)



Cristaux de calcium au niveau du tégument de la graine de *Geissois montana* (©LIVE/UNC)

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 92 espèces (certaines, nouvelles, sont en cours de descriptions), toutes endémiques, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et Hooglandia (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en NC contre 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en NC contre 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en NC contre 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbre de 5 à 6 mètres.
- Description des feuilles

Feuilles opposées, composées palmées, décussées, pétiolées (4-5 cm) à 3 ou plus souvent 5 folioles. Les folioles médianes sont elliptiques, 6-7 x 3-5 cm, acuminées à l'apex, glabres sur les deux faces, coriaces, avec une marge entière et un pétiolule de 2,5-3 cm. Les deux folioles latérales ont un pétiolule plus court avec un limbe identique aux folioles médianes. Le plus externe est quasi sessile avec un limbe plus petit asymétriquement oblique à la base. Les stipules sont intrapétiolaires, deux par nœud, elliptiques à ovales, de 0,5 cm de long, cordées à la base et rondes à l'apex avec des poils denses courts sur la face inférieure.

- Description de la fleur

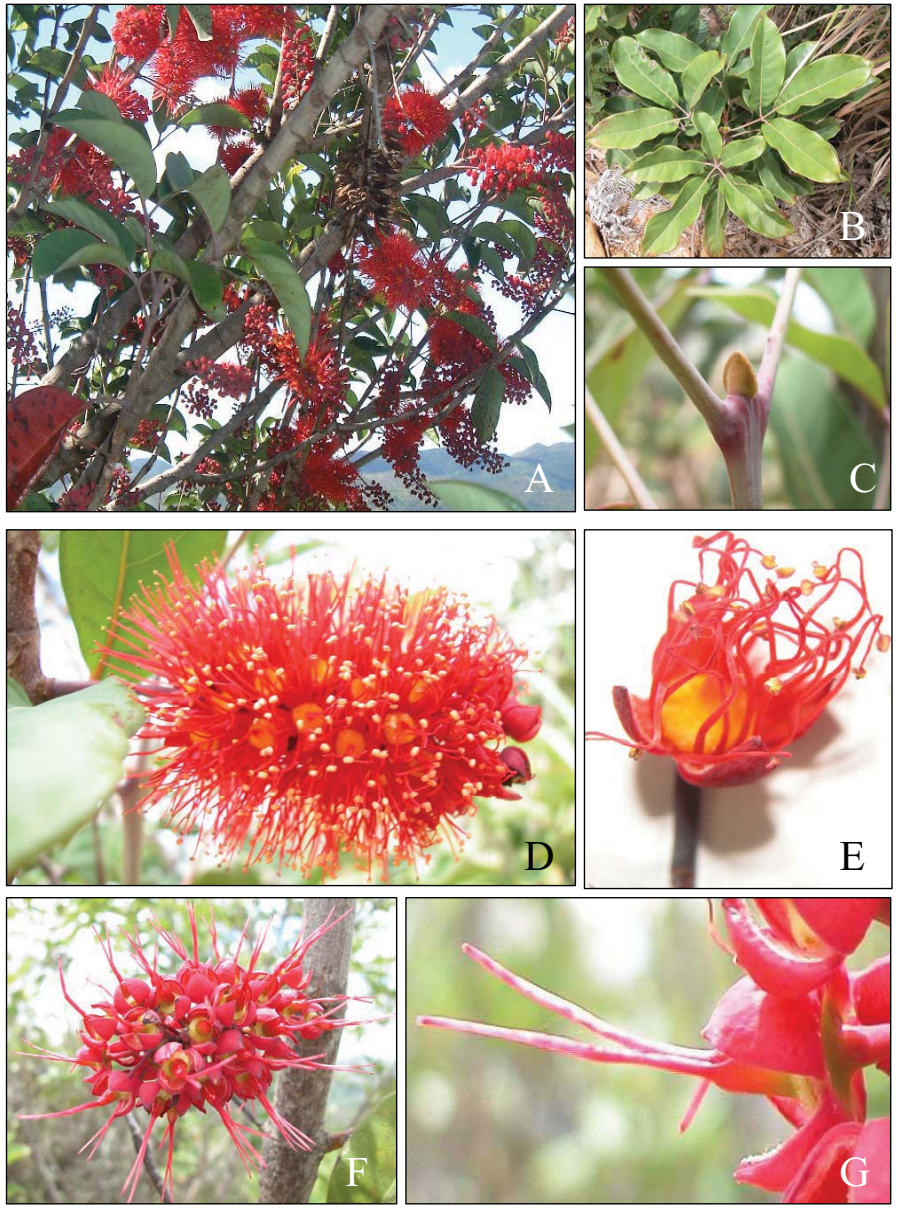
Inflorescence de 10-15 cm en racème rouge avec des fleurs organisées de manière irrégulières par 3 ou 5 par niveau. Le pédicelle mesure entre 0,5 et 1 cm de long. Fleurs bisexuées à 4 sépales glabres sur la face extérieure et velus sur la face intérieure, pas de pétales, 14-22 étamines, à ovaire glabre verdâtre ou jaunâtre à deux styles qui persistent sur le fruit.

- Description du fruit

Les infrutescences obtenues après fécondation des inflorescences sont des grappes de fruits organisées de manière étagée, chaque étage étant représenté par un verticille de 3, 4 ou 5 fruits.
Le fruit (1,3-1,8 x 0,5-0,8 cm) est une capsule cylindrique, vert quand jeune tournant au rouge puis finalement brun à maturité, à déhiscence septicide depuis l'apex.

Fruit et graines fertiles et infertiles de *Geissois pruinosa* (©LIVE/UNC)

Fruit de *Geissois pruinosa* en gros plan (©LIVE/UNC)



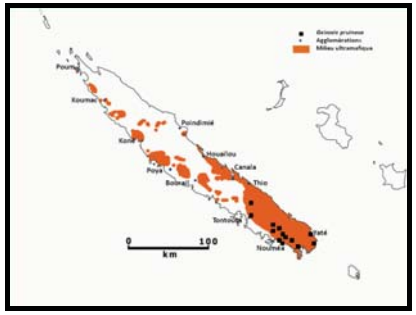
Photos de l'individu adulte : A, Plante entière ; B, feuilles ; C, stipule ; D, inflorescence ; E, fleur ; F, jeune infrutescence ; G: jeune fruit.

Habitat

On retrouve l'espèce sur maquis minier, surtout dans les ravins sur sol magnésien ou ferralitique.

Distribution géographique

Largement répandue au sud de la Grande Terre, depuis 0 mètres et jusqu'à 700 mètres d'altitude.



Distribution géographique de *G. pruinosa*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2004.

Technique et conseil de récolte

La récolte des semences doit intervenir seulement lorsque les fruits ont atteint le stade de maturité physiologique mais avant qu'ils ne soient ouverts, laissant échapper les graines ailées. Les infrutescences doivent donc être placées dans un sachet pour la collecte.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 133,3 (± 8,9) mg, soit 750 (± 50) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et sec pendant plusieurs mois

Description de la semence

1/ Structure externe :

La semence présente une forme grossièrement ovaloide, sa taille variant de 8,5-10 x 2,5-3 mm. La graine présente une partie ailée importante, plate (rôle dans la dissémination par le vent) de couleur marron clair (6-7 x 2.5-3 mm) et une partie située à l'autre extrémité de la semence, de forme ovale bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers de couleur marron plus foncé (2.5-3 x 1.5-2 mm).

La semence présente une couleur plus foncée que *G. montana*. Le tri visuel des graines d'aspect fertile et stérile est aisé du fait de la couleur plus foncée des graines fertiles avec une zone embryonnaire nettement bombée.

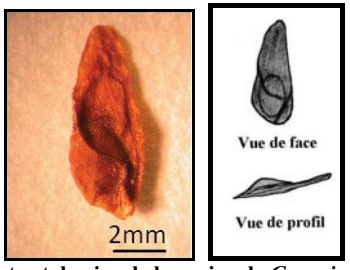
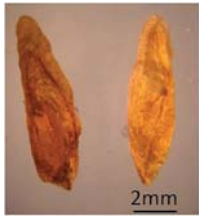


Photo et dessins de la graine de *G. pruinosa* (©LIVE/UNC)

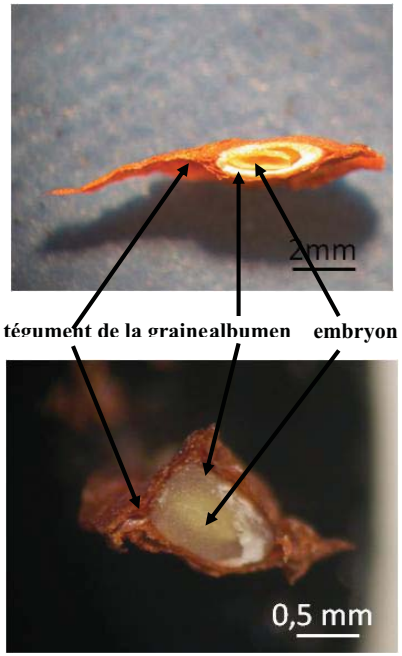


Comparaison entre *G. pruinosa* à gauche et *G. montana* à droite

2/ Structure interne

La semence présente une première couche tégumentaire externe et une couche tégumentaire interne.

L'amande de la graine est constituée d'un albumen de volume important dans lequel est contenu l'embryon de couleur plus jaunâtre, la graine est donc de type albuminée.

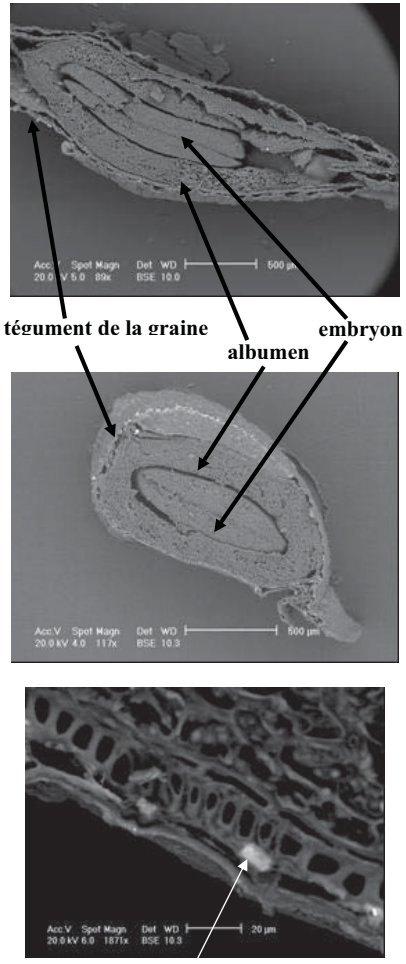


Coupe longitudinale (en haut) et transversale (en bas) de *G. pruinosa* observée à la loupe binoculaire.

3/ Ultrastructure

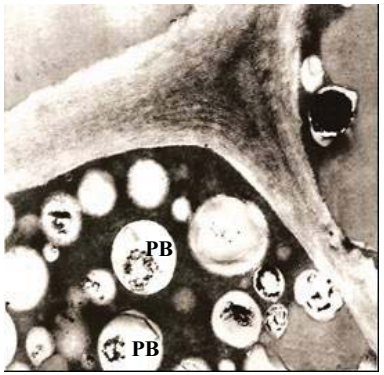
- *Microscopie électronique à balayage en surface*

L'observation révèle la présence de cristaux d'oxalate de calcium au niveau du tégument de la graine et confirme la présence d'un albumen développé avec un embryon positionné longitudinalement.

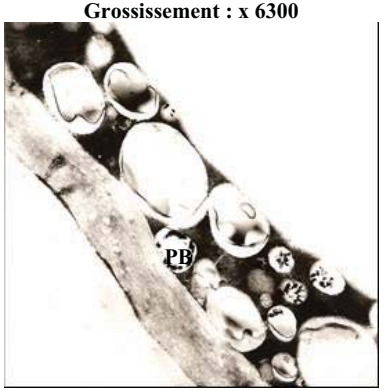


Coupes longitudinale (en haut), transversale (au milieu) de *G. pruinosa* et cristaux d'oxalate de calcium au M.E.B.

- *Microscopie à transmission électronique*

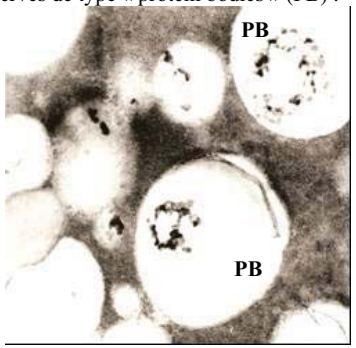


Grossissement : x 6300



Grossissement : x 8400

L'observation en microscopie à transmission électronique révèle la présence de structure de réserves de type « protein bodies » (PB) :



Grossissement : x 21500

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé 17.2005 :

- *Composition brute en protéines*

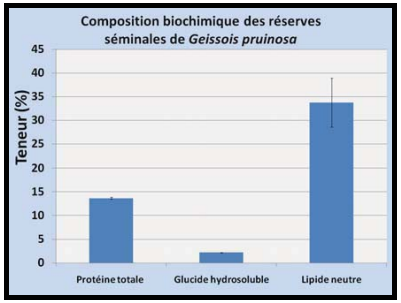
12,09 ± 0,19 mg/100mg de matière fraîche
13,66 ± 0,22 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

1,93 ± 0,03 mg/100mg de matière fraîche
2,18 ± 0,04 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

29,89 ± 4,56 mg/100mg de matière fraîche
33,76 ± 5,15 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids	(+/- SE)
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	14,59	0,573
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadecanoic	Palmitoleic	0,29	0,049
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	3,91	0,203
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	16,51	0,251
C 18:1Δ11	cis-11-Octadecanoic	Vaccenic	1,43	0,028
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	62,05	2,468
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	0,60	0,150
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,23	0,047
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic		0,09	0,034
C 22:0	Docosanoic	Behenic	0,08	0,033
C 24:0	Tetracosanoic	Lignoceric	0,11	0,018
Total of identified Fatty acids in seeds			99,89	3,785

Il est à noter qu'un acide gras minoritaire puisque ne représentant que 0,11% des acides gras totaux n'a pu être identifié et est en cours d'étude.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

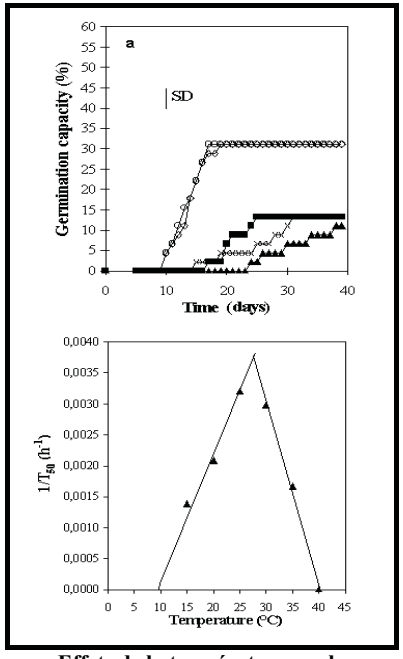
- Graine entière :
  7,91 % (+/- 0,41). (EP-lot 27.2006)
- Graine en poudre :
  11,47 % (+/- 0,55). (BF-lot 17.2005)

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Viabilité du lot de semence

Ce taux de viabilité dépend du lot considéré, mais se situe entre 60 et 75%, cependant certains lots peuvent présenter des taux plus faibles proches de 30%.

Germination (Fogliani *et al.*, 2004)

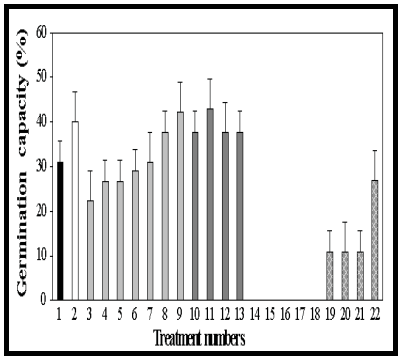


Effets de la température sur la germination de *G. pruinosa.*

En haut : Pourcentages de germination cumulées en fonction du temps à 15°C (▲), 20°C (■), 25°C (○), 30°C ( ), 35°C (✳). En bas : Effet de la température sur le taux de germination exprimé sous forme de l'inverse du temps nécessaire pour l'obtention de 50% de germination (T50).

La température optimale de germination a été déterminée pour cette espèce à 27-28°C avec un temps de latence de 8 jours. Pour des températures plus basses ou plus élevées, ce temps de latence est doublé et les taux de germination plus faibles.

La recherche des moyens d'optimiser cette germination révèle que plusieurs prétraitements sont efficaces, à savoir la scarification mécanique ou des bains d'eau chaude pour lesquels à 40°C, on obtient un taux de germination approximatif de 43%, contre 30% sans prétraitement.



Capacité maximale de germination des semences de *G. pruinosa* à 25°C en réponse à différents pré-traitements.

Traitements : 1 = Témoin. 2 = Scarification mécanique. 3 = Froid à 4°C, 2j. 4 = Froid à 4°C, 4j. 5 = Froid à 4°C, 7j. 6 = Froid à 4°C, 10j. 7 = Froid à 4°C, 14j. 8 = Froid à 4°C, 21j. 9 = Froid à 4°C, 28j. 10 = Eau chaude à 30°C. 11 = Eau chaude à 40°C. 12 = Eau chaude à 50°C. 13 = Eau chaude à 60°C. 14 = Eau chaude à 70°C. 15 = Eau chaude à 80°C. 16 = Eau chaude à 90°C. 17 = Eau chaude à 100°C. 18 = Acide sulfurique pur, 5 min. 19 = Acide sulfurique dilué au 1/2, 5 min. 20 = Acide sulfurique dilué au 1/4, 5 min. 21 = Acide sulfurique dilué au 1/8, 5 min. 22 = Acide sulfurique dilué au 1/16, 5 min.

Cette méthode est simple d'application et ne nécessite pas d'importants investissements financiers : dans des bains marie préalablement chauffés à 40°C, insérer les semences à scarifiées, et stopper le chauffage des bains immédiatement après leur immersion. Laisser refroidir les semences dans l'eau pendant 12h et semer les directement.

Semis

➢ **Pour le semis en milieu naturel dégradé**, la meilleure période pour l'optimisation de la germination des semences semble être de novembre à février, période chaude et à forte pluviométrie, avec une amplitude de température jour/nuit atteignant +/- 20°C. Cependant, il faut être extrêmement prudent à ne pas semer avant un passage orageux violent, ce qui favorise le lessivage des sols, et donc la perte des semences, et diminue les chances de survie des jeunes plantules germées. Par ailleurs, il semble que *Geissois pruinosa* se développerait plus efficacement dans une deuxième phase de plantation après un enrichissement du sol. (Fogliani *et al.*, 2007).

➢ **Pour le semis en pépinière**, il pourrait être très intéressant que les semis soient effectués à températures contrôlées (dans le cas présent, à 27°C), soit par l'utilisation d'une serre thermorégulée (coût excessif), soit par l'utilisation d'une étuve réfrigérée.

Pour cette proposition, la méthode est très simple : dans un bac, disposer sur un substrat qui présente une bonne capacité de rétention (vermiculite par exemple) les semences après prétraitement (voir plus haut).

Arroser abondamment, et recouvrer le bac de film plastique. Mettre à l'étuve préalablement réglée à 27°C, et ne pas hésiter à rajouter de l'eau si cela semble nécessaire. Replanter ensuite les jeunes plantules germées sur un substrat riche type terreau à condition qu'il soit mélangé à un substrat qui permet une bonne aération racinaire.

Si le prétraitement a été efficace, le taux de germination observé approchera les 50%.

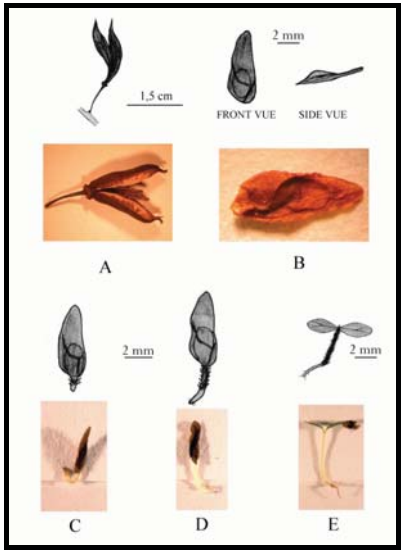
La croissance des plants est relativement rapide, 16 cm en huit mois et près de 80 cm après 18 mois sur le substrat précédemment cité.

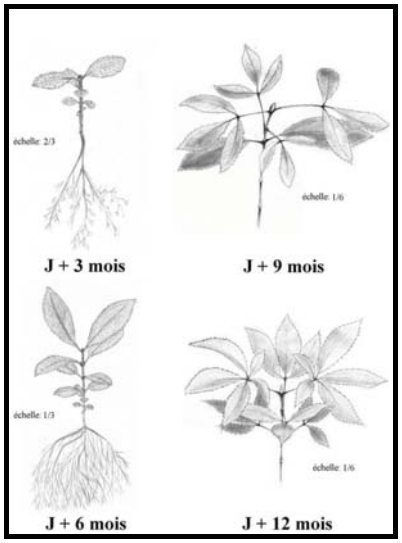
Jeune plant de 3 mois

Plant de 6 mois

Plant de 9 mois

Plant de 18 mois





Fiche descriptive de l'espèce du fruit à la plantule (Fogliani *et al.*, 2007)

Grevillea exul var. *exul*

Famille

Proteaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 43 espèces **toutes endémiques** réparties sur 9 genres dont 6 endémiques : *Beauprea, Beaupreopsis, Eucarpha, Garnieria, Kermadecia, Sleumerodendron*; 2 genres sub-endémiques : *Vitoria* et *Macadamia* ; 1 genre Australien : *Grevillea* et 1 genre Australo-Papou : *Stenocarpus*.

Il s'agit d'arbrisseaux, d'arbustes ou parfois de grands arbres, plus rarement des plantes herbacées.

Le genre *Grevillea* compte en Nouvelle-Calédonie 3 espèces **toutes endémiques.** Ce sont des arbustes ou arbres, souvent épineux (glabres en Nouvelle-Calédonie). En Nouvelle-Calédonie, ce genre autochtone comprend 3 espèces auxquelles ont été attribuées des sous-espèces.

Description de l'individu adulte

- Arbuste ou arbre pouvant atteindre 10 mètres; rameaux diffus couverts d'un revêtement rubigineux, rarement glabres; écorce grisâtre.

Allure générale de *Grevillea exul* var. *exul* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

Feuilles simples, alternes, pétiolées, étroites et coriaces, concentrées au sommet des axes, elliptiques, glabres dessus, un peu velues dessous; nervures bien visibles de teinte claire.

Feuillage de *Grevillea exul* var. *exul* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

Fleurs blanches, glabres ou un peu velues extérieurement sur des inflorescences simples ou ramifiées. Inflorescences terminales ou exceptionnellement axillaires. Fleurs apétales.

Inflorescence de *Grevillea exul* var. *exul* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Follicules de 12-20 x 9-15 mm, bossus, très bombés latéralement, brun foncé à maturité portés par une infrutescence ; 2 graines par fruit.

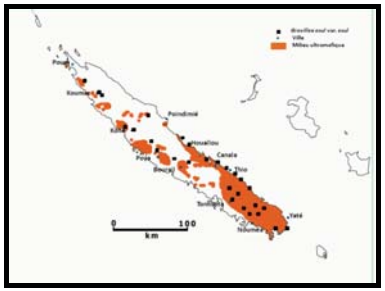
Fruits de *Grevillea exul* var. *exul* (©J. Barrault)

Habitat

On retrouve cette sous-espèce sur l'ensemble de la « Grande Terre » mais plus fréquemment sur la côte est et d'avantage sur la côte ouest jusqu'à Tiébaghi. On la retrouve sur massif péridotitique inféodée aux maquis miniers sur sols plus ou moins érodés ou ferrallitiques sur substrat ultramafique.

Distribution géographique

Elle se développe sur l'ensemble du massif péridotitique de la « Grande Terre » et à l'Ile des Pins entre 10 et 1050 mètres d'altitude.



Distribution géographique de *Grevillea exul* var. *exul*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Technique et conseil de récolte

La difficulté réside dans le fait que la maturité des fruits est très variable entre les peuplements voire au sein du même peuplement.

La floraison est étalée entre juin et novembre. La collecte des fruits s'effectue en janvier et février. Les fruits secs déhiscents doivent être collectés juste avant leur ouverture.

L'autre difficulté réside dans le fait que cette espèce fait très souvent l'objet d'attaques par un insecte quand le fruit est jeune, qui dégrade l'embryon.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec à la lumière ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 2,71 (± 0,04) g, soit environ 37 (± 3) graines/g.

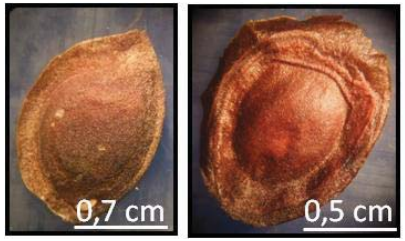
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (entre 12 et 15°C au froid sec)

Description de la semence

1/ Structure externe :

La taille des semences est de l'ordre de 1,1-1,3 x 0,8-0,9 cm. La graine est assez plate et dispose d'une partie faiblement ailée qui couvre tout son périmètre qui lui permet sans aucun doute une dissémination par le vent.

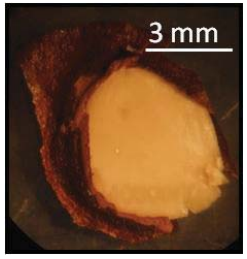


Graines de *Grevillea exul* var. *exul* (©LIVE/UNC)

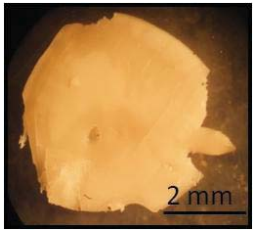
On peut voir que la partie centrale de la graine est plus bombée, elle correspond à la position de l'embryon.

2/ Structure interne

La dissection des semences révèle la présence d'une couche tégumentaire marron et d'un embryon volumineux blanc.



Embryon dans la graine de *Grevillea exul* var. *exul* (©LIVE/UNC)



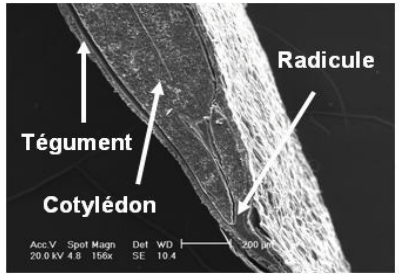
Embryon extrait de la graine de *Grevillea exul* var. *exul* (©LIVE/UNC)

Il est important de noter que l'embryon occupe tout l'espace, il s'agit donc d'une graine de type exalbuminé.

3/ Ultrastructure

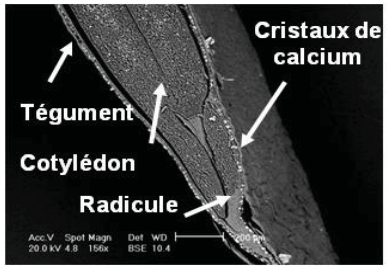
- *Microscopie électronique de surface*

L'observation confirme le type exalbuminé puisqu'on ne distingue que le tégument de la graine et l'embryon :



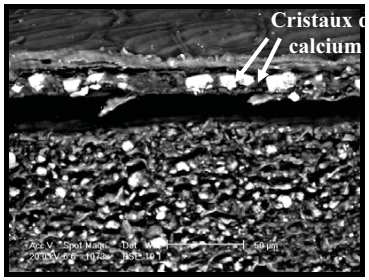
Coupe longitudinale d'une graine de *Grevillea exul* var. *exul* observée au MEB (©LIVE/UNC)

La même observation en mode retrodiffusé qui permet de mettre en évidence les contrastes chimiques révèle la présence de cristaux de calcium en nombre au niveau du tégument :

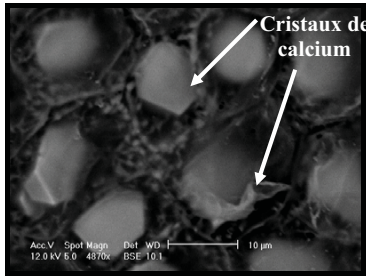


Coupe longitudinale d'une graine de *Grevillea exul* var. *exul* observée au MEB (©LIVE/UNC)

L'observation de ces cristaux semble montrer qu'il s'agit de cristaux d'oxalate de calcium :



Zone tégumentaire et cotylédon en mode rétrodiffusé (©LIVE/UNC)



Observation en gros plan des cristaux d'oxalate de calcium (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

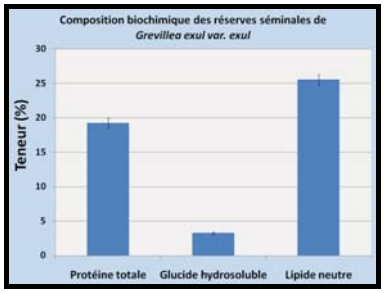
17,59 ± 0,63 mg/100mg de matière fraîche
19,28 ± 0,68 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

3,00 ± 0,11 mg/100mg de matière fraîche
3,29 ± 0,14 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

23,70 ± 0,70 mg/100mg de matière fraîche
25,56 ± 0,75 mg/100mg de matière sèche



L'analyse de la composition des réserves séminales montre une prédominance de la fraction lipidique. La graine de *Grevillea exul* var. *exul* est donc une semence de type oléagineuse. Les réserves sont aussi composées de protéines qui représentent 19,28% de l'ensemble des réserves.

Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides neutres :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids
C 14:0	Tetradecanoic	Myristic	tr
C 14:1Δ9	cis-9-Tetradecanoic	Myristoleic	1,28
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	0,77
?			0,33
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadecanoic	Palmitoleic	0,22
C 16:1Δ11			20,80
C 17:1Δ10			0,18
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	1,32
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	30,07
C 18:1Δ11			
C 18:1Δ13			9,58
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	1,10
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,79
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic	Eicosenoic	1,28
C 20:1Δ15			1,89
C 22:0	Docosanoic	Behenic	1,00
C 22:1Δ13	cis-13-Docosenoic	Erucic	0,48
C 22:1Δ17			2,06
C 24:0	Tetracosanoic	Lignoceric	1,88
C 24:1Δ15	cis-15-Tetracosenoic	Nervonic	1,02
C 24:1Δ19			4,35
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			80,40

Les résultats de l'analyse de la composition en acide gras de la fraction de lipide neutre montre une prédominance des acides gras insaturés et notamment la présence d'une série d'acides gras particuliers connue sous le nom d'oméga 5. Ces derniers ont fait l'objet d'une publication sous presse dans la revue Journal of American Oil Chemists Society (Bombarda et al., 2010). Cependant, la publication fait référence aux acides gras constitutifs de la fraction lipide neutre de *Grevillea exul* var. *rubiginosa* et d'une Rhamnaceae, *Alphitonia neocaledonica*. On a donc confirmation de la présence de ces acides gras rares au niveau de *Grevillea exul* var. *exul* et de leur quantité importante au niveau de ces semences.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine en poudre : 8,75 % (± 0,03).

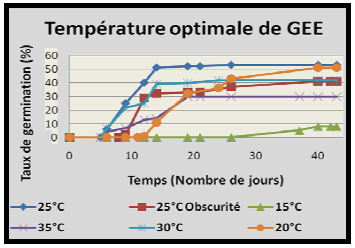
Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Viabilité du lot de semence

Un seul lot étudié avec une viabilité de 53% (± 12)

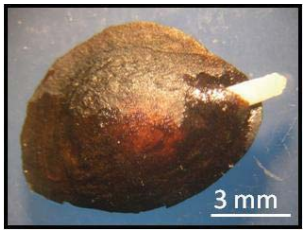
Germination

Une étude de l'influence de la température sur la germination des graines de cette espèce a été réalisée. Elle révèle que les meilleures températures sont de l'ordre de 20 à 35°C avec des taux de germination assez élevés.



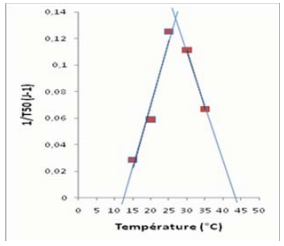
Courbes de germination de *G. exul* var. *exul* à différentes températures

L'optimum de germination est obtenu après 14 jours à 25°C et se situe à 53% soit 100% des graines viables. Le temps de latence est de 6 jours.
A 20°C, la germination s'étale de manière plus progressive du 12ème jour jusqu'au 38ème pour atteindre un maximum de germination (51%) proche de l'optimum.
En revanche une très faible germination est observée à 15°C.



Graine de *G. exul* var. *exul* germée (©LIVE/UNC)

Il existe une corrélation positive entre le taux de germination (exprimé par le T50) et la température de 0 à 25°C.
Pour les températures supérieures, 30 à 40°C, il y a une corrélation négative.
En utilisant la droite de régression (Özbingöl et al., 1998), la température optimale est donnée par l'intersection des deux droites de régressions. Elle est donc ici entre 27 et 28°C. L'extrapolation de ces deux droites donne la température minimale 13°C et la température maximale de germination de 43°C.



Effets de la température sur la germination de *G. exul var. exul*

Gymnostoma chaemacyparis

Famille

Casuarinaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 11 espèces réparties sur 2 genres.

Le genre *Casuarina* compte 3 espèces dont deux endémiques. L'espèce introduite, la plus connue étant le « bois de fer », *Casuarina collina.*

Le genre *Gymnostoma* quant à lui est représenté par 8 espèces **toutes endémiques** dont l'espèce *G. chaemacyparis.* Tous les *Gymnostoma* du territoire sont associés à des bactéries actinomycètes fixatrices d'azote, du genre *Frankia* ce qui contribue à améliorer la teneur en azote du sol.

Description de l'individu adulte

- Arbuste à arbre de 3 à 6 mètres.

Pied adulte de *G. chaemacyparis* *in situ* (©J.L. Ruiz)

- Description des feuilles

Feuilles réduites à de petites écailles triangulaires.

- Description de la fleur

Fleurs réduites, unisexuées. Inflorescence mâle en chatons d'étamines, et femelle en cônes de gynécées formés de deux carpelles.

- Description du fruit

Les fruits résultent du développement des cônes femelles lignifiés. Ils sont constitués de loges (1 loge contenant 1 graine ailée).

Fruit de *G. chaemacyparis* en gros plan sur un pied femelle (©LIVE/UNC)

Habitat

On retrouve l'espèce surtout en maquis. Elle s'installe préférentiellement sur des sols magnésiens et sur du sol issu de roche serpentinique.

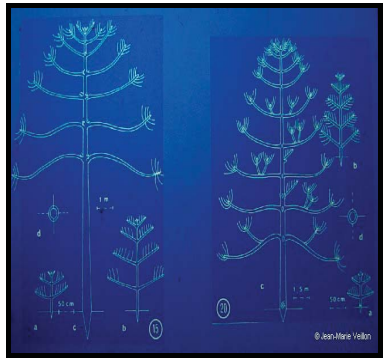
Distribution géographique

Largement répandue entre 0 et 600 mètres d'altitude au pied des massifs miniers.

Figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2004.

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle de Rauh :



Technique et conseil de récolte

L'espèce *Gymnostoma chamaecyparis* fleurit du mois d'août à septembre et les fruits mûrissent de mi-décembre à mi-février. Ils peuvent être récoltés lorsqu'ils commencent à brunir ou à rougir. Ils s'ouvrent en quelques jours à température ambiante libérant ainsi les semences mûres. La période de maturation des semences a lieu de janvier à septembre (Jaffré & Rigault, 1991).

L'espèce étant dioïque, il semble important de récolter les fruits dans une zone où l'on retrouve des individus males et ceci pour augmenter la proportion de graines fertiles par rapport aux infertiles : ovulodes. (Roumagnac *et al.*, 2004).

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et sous des néons ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 0,26 (± 0,01) g, soit environ 380 (± 20) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante le taux de germination chute rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

La distinction entre les ovulodes et les graines fertiles n'est pas aisée à l'œil nu, seule la dissection permet de le constater. Le lot en notre possession contenait malheureusement une forte proportion d'ovulodes, ce qui a rendu les expérimentations de germination difficilement interprétables.

Les graines sont fortement ailées et marrons claires. Elles mesurent environ 1 cm de long, 4 mm de large, sont relativement plates (1 mm d'épaisseur) et sont bombées au niveau de l'embryon. La partie ailée facilite sans aucun doute une dissémination par le vent puisqu'elle occupe plus de 2/3 de la surface de la graine.

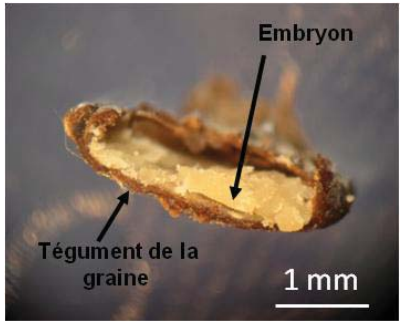
Ensemble de graines fertiles et infertiles de *G. chaemacyparis* (©LIVE/UNC)

Graine fertile de *G. chaemacyparis* avec son tégument ailé (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La semence présente une couche tégumentaire relativement fine.

Les coupes semblent montrer la présence d'un large embryon et l'absence d'albumen, la graine serait donc de type exalbuminé.

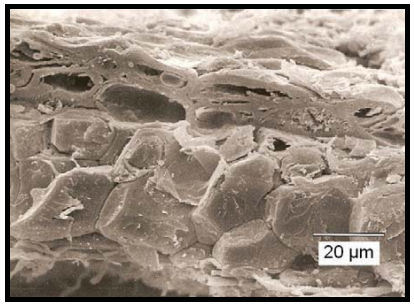


Coupe transversale de la graine de *G. chaemacyparis* (©LIVE/UNC)

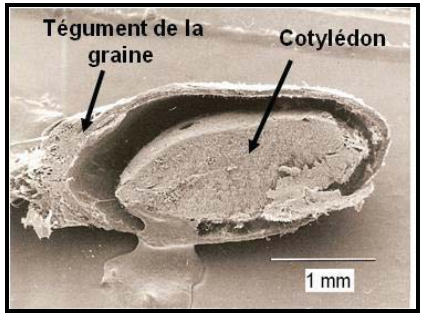
3/ Ultrastructure

- *Microscopie électronique de surface*

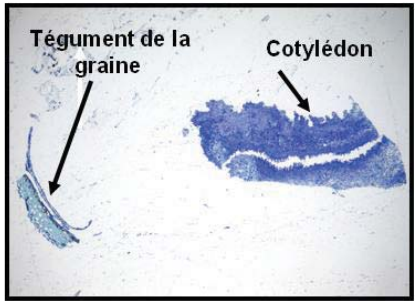
L'observation du tégument révèle en surface deux couches de tissus, l'une épaissie et l'autre plus large :



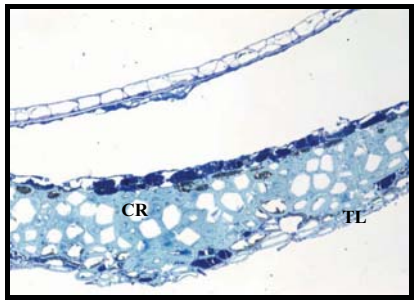
La coupe transversale de la graine entière confirme nettement la présence d'un embryon volumineux représenté ici par ses deux cotylédons :



- *Microscopie optique (x 400)*



L'observation en microscopie optique n'a pas permis d'obtenir une coupe parfaite, cependant, on a pu y distinguer d'une part le tégument et d'autre part la zone cotylédonaire.



Le tégument observé ici montre les deux types de tissu l'un plus longitudinal (TL) et fin alors que le second semble posséder des cristaux (CR).

4/ Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé M1 :

- *Composition brute en protéines*

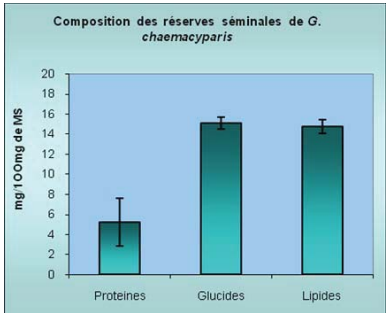
4,75 ± 2,16 mg/100mg de matière fraîche
5,19 ± 2,36 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

13,81 ± 0,53 mg/100mg de matière fraîche
15,10 ± 0,58 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

13,50 ± 0,62 mg/100mg de matière fraîche
14,76 ± 0,68 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides neutres :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids	(+/- SE)
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	6,34	0,46
C 16:1Δ9	cis-9-Hexadecanoic	Palmitoleic	0,12	0,01
C17:0		Margaric	0,14	0,03
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	5,73	0,33
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	10,40	0,48
C 18:1Δ11	cis-11-Octadecanoic	Vaccenic	0,71	0,07
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	74,69	7,51
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	0,69	0,05
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,53	0,06
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic		0,13	0,00
C 20:2Δ11,14	cis,cis-11,14-Eicosadienoic		0,02	0,01
C 20:4n6Δ5,8,11,14	all-5,8,11,14-Eicosatetraenoic	Arachidonic	0,04	0,00
C 21:0		Heneicosanoic	0,05	0,00
C 22:0	Docosanoic	Lignoceric	0,29	0,03
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			99,86	8,98

Plus de 75% du total des acides gras sont représentés par des acides gras insaturés. Un autre point remarquable est la forte proportion d'acide linoléique avec plus de 70%.
Il est à noter qu'une faible quantité d'acides gras présents en trace n'a pu être identifiée. Ceux-ci sont en cours d'étude.

5/ Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine en poudre :
  8,54 % (± 0.36).

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

6/ Viabilité du lot de semence

Le taux de viabilité du lot est de 12%.

7/ Germination

L'étude de l'influence de différents traitements a été réalisée. Ces traitements sont:
-Eau chaude : 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C
-Eau bouillante : 1, 2, 5 min
-H_2SO_4 98% dilué au ¼ : 1,5 ,10 min
-Scarification au scalpel
-Eau fumigée : 6, 12, 24h après scarification au papier de verre.

Seules des germinations significatives ont été notées au niveau des témoins incubés à la lumière n'ayant subi aucun traitement, après 40 jours d'observation avec des premières germinations au 20^{e} jour.

Joinvillea plicata

Famille

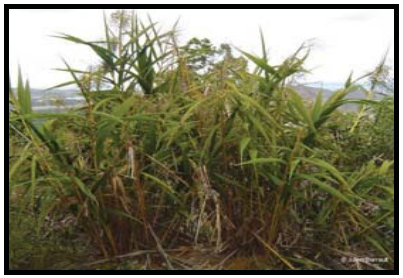
Joinvilleaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 2 espèces du même genre *Joinvillea*. Les 2 espèces sont autochtones. Ce sont de très grandes plantes herbacées rhizomateuses.

Description de l'individu adulte

- Herbe pérenne, rhizomateuse, qui se développe essentiellement dans les lieux humides. Elle peut atteindre 2-5 mètres de hauteur.



Pieds adultes de *Joinvillea plicata in situ*
(©J. Barrault)

- Description des feuilles

Les feuilles sont des grandes lames sessiles qui peuvent atteindre 1 m de longueur.

Feuillage de *Joinvillea plicata*
(©J. Barrault)

- Description de la fleur

Les fleurs sont regroupées sur des inflorescences de type panicules, très ramifiés.

- Description du fruit

Joinvillea plicata fructifie abondamment en juillet-août.

Infructescence de *Joinvillea plicata*
(©D. & I. Létocart)

Habitat

L'espèce se développe essentiellement dans les lieux humides, sur les sols ferralitiques ou sur les terrains volcano-sédimentaires.

Distribution géographique

On la retrouve jusqu'à 1000 mètres d'altitude.

Distribution géographique de *Joinvillea plicata*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

J. plicata fructifie abondamment en juillet-août. Il est recommandé de récolter les infructescences lorsque les fruits sont matures, c'est-à-dire lorsqu'ils sont de couleur noire.

Extraction et conditionnement des graines

Les infructescences sont mises à sécher au sec à la lumière sous des néons ou au soleil. Les graines germent mieux lorsqu'elles sont extraites en les séparant de la pulpe des fruits dès leur récolte (Jaffré et Pelletier, 1992).

Données quantitatives

Poids de 100 fruits : 1,85 (± 0,07) g,
soit environ 54 (± 4) graines/g.

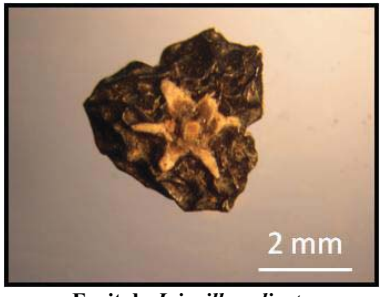
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid sec

Description de la semence

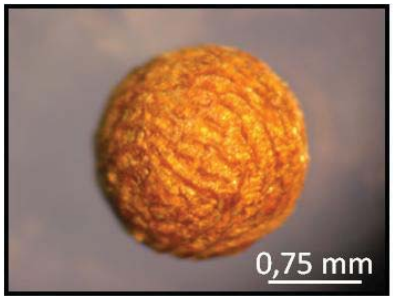
1/ Structure externe :

- Le fruit :
C'est une drupe globuleuse, noire, légèrement aplatie dorso-ventralement. Il mesure 4-6 x 3-3,5 mm et peut contenir 3 graines rondes de 1-1,5 mm de diamètre. Le fruit possède une odeur particulière assez similaire à la cannelle.



Fruit de *Joinvillea plicata*
(©LIVE/UNC)

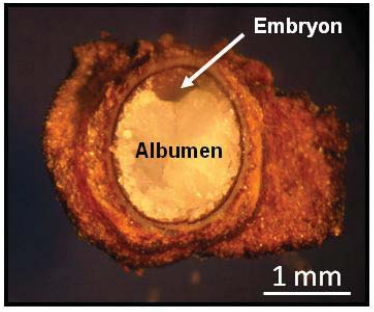
- La graine :
Elle présente une forme sphérique avec 0,15 cm de diamètre, une surface ondulée, et est rugueuse au toucher.



Graine entière de *Joinvillea plicata*
(©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La graine est occupée par un albumen blanc très volumineux, de structure relativement granuleuse, et par un embryon de forme lenticulaire peu développé. La semence présente des couches tégumentaires relativement épaisses.



Coupe transversale de graine entière de *Joinvillea plicata*
(©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

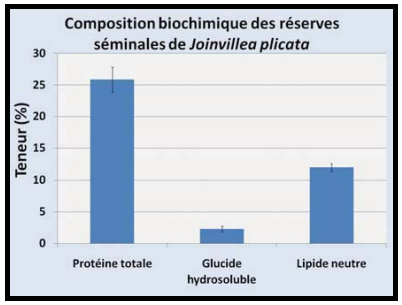
23,84 ± 1,83 mg/100mg de matière fraîche
25,85 ± 1,98 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

2,13 ± 0,43 mg/100mg de matière fraîche
2,31 ± 0,46 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

11,09 ± 0,55 mg/100mg de matière fraîche
12,03 ± 0,59 mg/100mg de matière sèche



Les réserves des semences de *Joinvillea plicata* sont essentiellement constituées de protéine avec 25,85%. La fraction lipidique neutre est la seconde plus importante réserve avec 12,03%. La semence de *Joinvillea plicata* est donc une semence de type protéagineuse.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la semence :

- Fruit :
  9,01 % (±0.77).

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Viabilité du lot de semence

D'après le test au chlorure de tétrazolium,
92 ± 7 embryons sont viables sur 100 fruits.

Germination

L'étude de l'influence de différents traitements a été réalisée. Ces traitements sont un traitement à :
-Eau chaude : 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C
-Eau bouillante : 1,2, 5 min
-H_2SO_4 98% dilué au ¼ : 1,5 ,10 min
-Scarification au papier de verre
-Eau fumigée : 6, 12, 24h après scarification au papier de verre.

Des germinations significatives ont été notées au niveau des semences ayant subi un trempage dans de l'eau chaude à 70 et 80°C avec 3 et 5% de germination, avec un temps de latence d'environ 28 jours.

Famille

Proteaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 43 espèces en Nouvelle-Calédonie toutes endémiques, réparties sur 9 genres. Le genre *Knightia* compte 2 espèces qui sont endémiques de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbuste mesurant de 4 à 6 mètres de hauteur. Les rameaux sont plus ou moins dressés, les jeunes sont comprimés et velus alors que les âgés sont plutôt arrondis et glabres

Allure générale de *Knightia deplanchei* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

Feuilles simples de 3 à 10 cm de long et 1 à 3 cm de large. Elles peuvent être glabres, minces ou très coriaces, arrondies ou dentées au sommet, plane à la base ou un peu récurvées, avec les nervures bien visibles. Présence de pétiole court et robuste.

Feuilles de *Knightia deplanchei* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

Les fleurs se présentent sur des inflorescences courtes terminales en bout d'axes ou plus rarement axillaires des dernières feuilles. Elles sont hermaphrodites, pédicellées et par paires.
Les fleurs sont de couleur orange vif à jaune vif ou rose saumoné.

- Description du fruit

Il s'agit d'un fruit sec dérivant d'un carpelle isolé et s'ouvrant par une seule fente, autrement dit les fruits sont sous formes de follicules épais, asymétriques, arrondis au sommet, fortement comprimés latéralement de forme allongée. Les follicules s'ouvrent complètement en 2 valves où se trouvent les graines ailées.

Fruits verts de *Knightia deplanchei* (©LIVE/UNC)

Fruits secs ouverts de *Knightia deplanchei* (©LIVE/UNC)

Particularités

Arbuste à vocation horticole du fait de la beauté de ses fleurs.

Habitat

Elle se développe aussi bien en forêts humides ouvertes qu'en maquis miniers. Elle s'installe sur sol plus ou moins profond ou érodé sur substrat ultramafique.

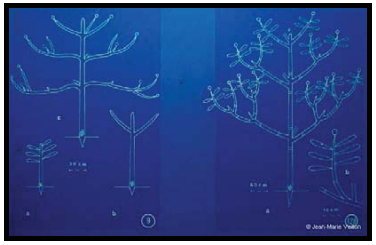
Distribution géographique

Présente uniquement sur la « Grande Terre », dans le sud, sur la cote est au niveau de Canala et le long de la cote ouest. On peut la retrouver à des altitudes comprises entre 100 et 1200 mètres.

Distribution géographique de *Knightia deplanchei*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle de Scarrone.



Phénologie

- Floraison de mars à août

Données quantitatives

Poids de 5 graines : 1,498 (± 0,469) mg, soit 334 (± 80) graines/g.

Description de la semence

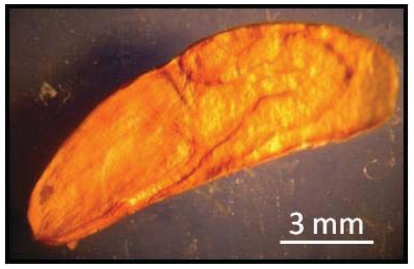
1/ Structure du fruit :

Dans un fruit se retrouve deux graines, chacune dans une loge carpellaire dont la fente de déhiscence est longitudinale.

Carpelles de *Knightia deplanchei* (©LIVE/UNC)

2/ Structure externe :

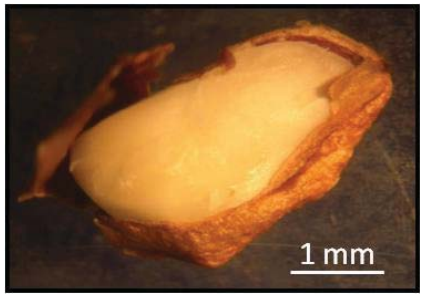
La taille des semences est de 1,2-1.6 x 0.3-0.5 cm avec la partie ailée. Cette graine est ailée, de forme allongée et plate.
La partie ailée est de couleur plus claire que la partie, où se trouve l'embryon, qui est de couleur marron. La partie ailée est très fragile et se casse très facilement.



Graine de *Knightia deplanchei* avec la partie ailée (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine de type exalbuminé, en effet on n'observe pas d'albumen.



L'embryon dans la graine de *Knightia deplanchei* (©LIVE/UNC)

L'embryon de *Knightia deplanchei* (©LIVE/UNC)

La dissection met en évidence une couche tégumentaire très fine.

On peut constater l'absence d'albumen, en effet l'embryon occupe tout l'espace.

La radicule sort du coté le plus arrondi (vers le haut sur la photo).

Famille

Rutaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 85 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 78 sont endémiques, réparties sur 21 genres. Le genre *Melicope* compte 8 espèces **toutes endémiques** de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbuste monocaule, grêle, élancé de 2 à 4m et peu ramifié.

- Description des feuilles
  Possèdent une à trois folioles, à revers velus de couleur vert foncé en dessus et clair en dessous. Feuilles allongées pouvant faire 30-40 × 24cm.

Feuilles de *Melicope lasioneura*
(©LIVE/UNC)

- Description de la fleur
  Cauliflorie axillaire éparse. Fleurs groupées par 2 à 5 tout le long de la tige, de couleur blanc jaunâtre, bourgeon violet. Les pétales sont longs et les sépales courts, style court avec quelques poils à la base, étamines en filets. Ovaires glabres, filets staminaux aplatis et ciliés, 8 étamines, anthères jaunes.

- Description du fruit
  Fruit caulinaire en quatre parties de couleur rouge violacée. Graines noires luisantes dans une coque brune.

Fruits de *Melicope lasioneura*
(©D. & I. Létocart)

Habitat

Elle se développe aussi bien en forêts denses humides éclairées ou en sous bois. Elle s'installe préférentiellement sur des terrains ferralitiques gravillonaires et schistes péridotites.

Distribution géographique

Largement répandue au sud de la « Grande Terre », depuis 250 mètres et jusqu'à 900 mètres d'altitude.

Distribution géographique de *Melicope lasioneura*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- Fructification principalement de septembre à mars
- Floraison principalement de juin à octobre

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

- Récolte des fruits noirs.

Fruit de *Melicope lasioneura*
ouvert avec graines (©LIVE/UNC)

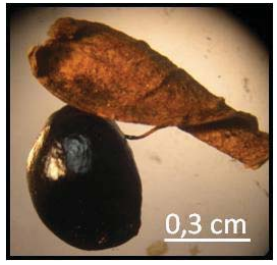
Données quantitatives

Poids de 1 graine : 50,2 (± 4) mg,
soit 19 (± 2) graines/g.

Description de la semence

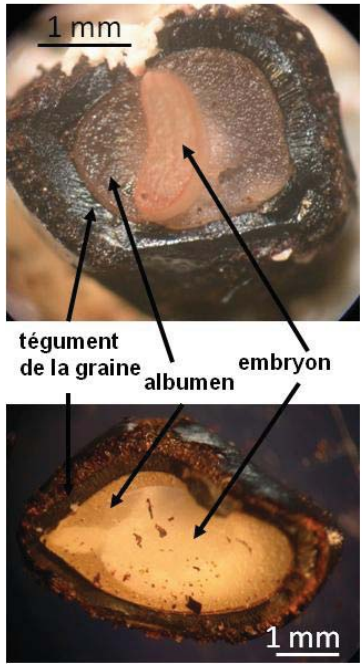
1/ Structure externe :

La taille des semences est de 0,5-0,6 x 0,3-0,4 cm pour 3 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ovale bombée.
Elle est de couleur noire avec un aspect très lisse et luisant.



Graine entière de *Melicope lasioneura*
(©LIVE/UNC)

2/ Structure interne



Coupe transversale (en haut) et longitudinale (en bas) de la graine de *Melicope lasioneura*
(©LIVE/UNC)

La dissection met en évidence une couche tégumentaire épaisse, striée, cette dernière étant sûrement un inhibiteur mécanique de la germination de la graine.

Graine de type albuminé (observation d'un embryon placé au milieu du tissu nourricier).

L'embryon est axile, c'est-à-dire que celui-ci est placé dans l'axe de la graine.

Montrouziera sphaeroidea

Famille

Guttiferae

Généralités sur la famille

La famille comporte 24 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 21 sont endémiques, réparties sur 5 genres. Le genre *Montrouziera* compte 6 espèces toutes endémiques de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbuste multicaule de 3 à 11m avec une sève de couleur jaune. Cime arrondie

Allure générale de *Montrouziera sphaeroidea* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles
  Feuilles vert foncé brillantes sur le dessus et de couleur vert clair en dessous.

- Description de la fleur
  Bouton de couleurs rouge à rose. Fleurs à pétales rose foncé, étamines jaunes en 5 faisceaux. Sépales verts. Pistil jaune vert. Fleurs à odeur de miel.

Fleurs de *Montrouziera* (©D. & I. Létocart)

- Description du fruit

  Fruits de couleur verte mesurant 7 cm de long et 6,5 cm de large.

Fruit vert de *Montrouziera sphaeroidea* (©LIVE/UNC)

Habitat

Elle se développe essentiellement en maquis miniers mais aussi en formation paraforestière. Elle s'installe préférentiellement sur des terrains ultramafiques, sur sol issu de roche serpentinique.

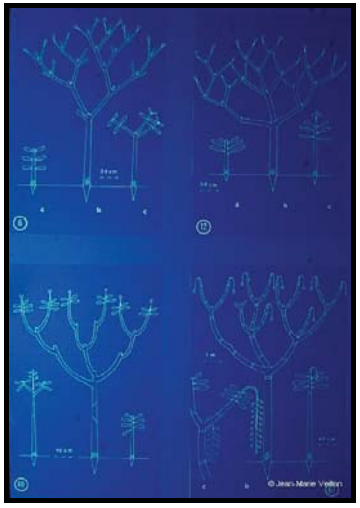
Distribution géographique

Largement répandue au sud de la Grande Terre, depuis 50 mètres et jusqu'à 1000 mètres d'altitude. Présente dans le nord mais totalement absente des Loyautés.

Distribution géographique de *Montrouziera sphaeroidea*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Particularités biologiques

La morphologie de cette espèce suit celle du modèle de Leeuwenberg.



Phénologie

- Fructification principalement de mai à septembre.
- Floraison principalement de novembre à décembre

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

- De juin à septembre

Technique et conseil de récolte

- Au sécateur

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 50,48 (± 1,57) g, soit 2 (± 2) graines/g.

Description de la semence

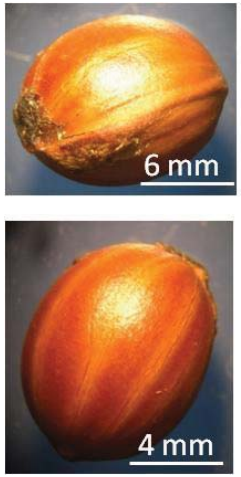
1/ Structure du fruit :

Dans un fruit se retrouve une dizaine de graines. Elles sont collées entre elles. Elles sont recouvertes d'une pulpe visqueuse et difficile à enlever.

Fruit mur ouvert de *Montrouziera sphaeroidea* (©D. & I. Létocart)

2/ Structure externe :

La taille des semences est de 1,3-1,5 x 0,8-1,0 cm pour 0,7 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ovale allongée. Elle est de couleur marron clair à marron foncé. Elle présente un aspect lisse.

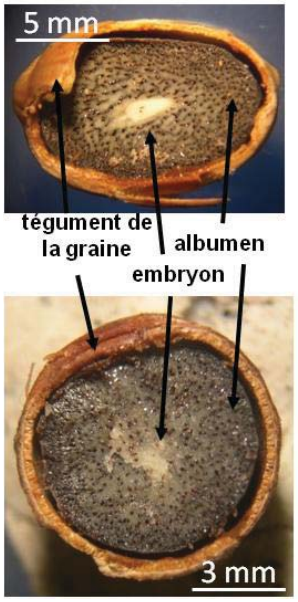


Face dorsale (en bas) et ventrale (en haut) d'une graine de *Montrouziera sphaeroidea* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

La dissection met en évidence une couche tégumentaire de 0,5 mm d'épaisseur, facilement détachable.

Au niveau de la coupe longitudinale, on observe des filaments en longueur, et sur la coupe transversale, on observe un nombre important de points plus foncé. L'intérieur a un aspect plutôt gras, on observe même un liquide jaunâtre en appuyant.



Coupe longitudinale (en haut) et transversale (en bas) d'une graine de *Montrouziera sphaeroidea* (©LIVE/UNC)

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces, **toutes endémiques**, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle-Calédonie sur 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle-Calédonie sur 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle-Calédonie sur 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbre monocaule à peu ramifié de 2 à 6 mètres.

- Description des feuilles

Feuilles verticillées par 3, composées à 5-7 folioles.

Folioles hirsutes fauves sur les deux faces, sessiles, à marge légèrement dentée. Folioles basales (2-2,5 x 1,5-1,8 cm) plus petites que les intermédiaires (4-6 x 2-3 cm), elles mêmes plus petites que les terminales (10-11 x 6-7 cm). Nervures saillantes en dessous.

Stipule elliptique de 1-2 x 0,5-1 cm totalement hirsute fauve.

Vue d'un rameau monocaule avec inflorescences mâles de *Pancheria hirsuta* (©JC. Bradford)

- Description de la fleur

Inflorescence en tête sphérique (1-2 cm de diamètre) hirsute à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule de 2-2,5 cm. Inflorescence femelle de couleur jaune et mâle de couleur blanche.

Inflorescences mâles de *Pancheria hirsuta* en cours d'épanouissement (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Infrutescence en tête sphérique (2,8-3,4 cm de diamètre) avec environ 110 (±10) fruits, à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule pubescent de 2-2,5 cm.

Infrutescences de *Pancheria hirsuta* sur pied (©LIVE/UNC)

Infrutescence de *Pancheria hirsuta* à la loupe binoculaire (©LIVE/UNC)

Infrutescence de *Pancheria hirsuta* en gros plan montrant les fruits ouverts (©LIVE/UNC)

Fruits secs déhiscents de 1 cm avec un pédicelle de 2 mm, s'ouvrant en deux fentes du haut vers le bas sur la moitié de la longueur. Valve pubescente.

Fruit de *Pancheria hirsuta* vu de face (©LIVE/UNC)

Fruit de *Pancheria hirsuta* vu de profil (©LIVE/UNC)

Distribution géographique

Pancheria hirsuta est principalement localisée dans le sud de la « Grande Terre » sur sol issu de roche ultramafique.

Distribution géographique de *Pancheria hirsuta*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 25 (± 0,25) mg,
soit 4000 (± 40) graines/g.

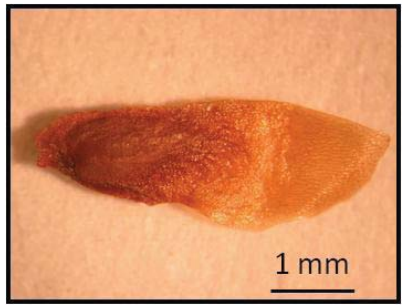
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et au sec pendant quelques mois (le taux de germination passe de 80 à 20% en 5 mois)

Description de la semence

1/ Structure externe :

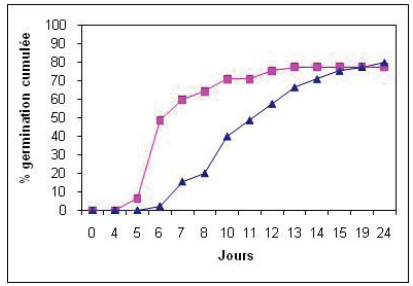
La semence présente une forme grossièrement ovoïde, sa taille variant de 4-5 x 0.8-1 mm. La graine présente une partie ailée importante occupant plus de la moitié de la surface, plate (rôle dans la dissémination par le vent) de couleur marron clair et une partie de forme ovale bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers de couleur marron plus foncé occupant l'autre moitié de la graine.



Graine de *Pancheria hirsuta* observée à la loupe binoculaire (©LIVE/UNC)

Germination

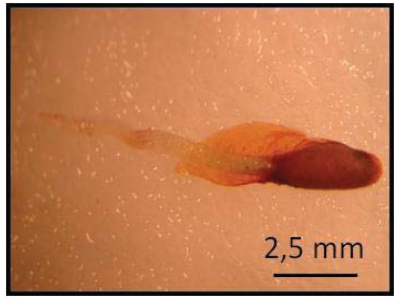
Du fait d'une faible quantité de graines, seule une expérience de germination a pu être menée à 25°C à l'obscurité ou à la lumière.



Graphique représentant le taux de germination des graines de *P. hirsuta* en fonction du temps à 25°C à l'obscurité (▲) ou à la lumière continue (■).

Les résultats montrent une germination rapide dès le 5ème jour à la lumière et le 6ème jour à l'obscurité.

Quelle que soit l'expérience considérée, le taux maximal de germination atteint des valeurs proches de 80%. Il est à noter que ce taux est plus rapidement atteint à la lumière (19 jours) qu'à l'obscurité (24 jours).



Graine germée de *Pancheria hirsuta* (©LIVE/UNC)

Il est intéressant de noter que la zone de sortie de la radicule est située dans la partie médiane alors qu'elle l'est dans la partie basse pour les espèces du genre *Geissois*.

Jeune plantule de *Pancheria hirsuta* (©LIVE/UNC)

Remarque : Aucune autre étude spécifique n'a été à ce jour menée sur cette espèce faute de quantité suffisante.

Famille

Cunoniaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie environ 98 espèces, **toutes endémiques**, sur les 370 reconnues au monde. Elle regroupe un total de 28 genres dont 7 représentés en Nouvelle-Calédonie :
Les genres *Codia* (environ 14 espèces), *Pancheria* (environ 30 espèces) et *Hooglandia* (1 espèce) sont endémiques. Le genre *Cunonia* possède 23 espèces endémiques sur les 24 connues au monde.
Les genres *Acsmithia* (environ 10 espèces en Nouvelle-Calédonie sur 17 dans le monde), *Geissois* (environ 13 espèces en Nouvelle-Calédonie sur 19 dans le monde) et *Weinmannia* (environ 6 espèces en Nouvelle-Calédonie sur 150 dans le monde) ont des aires de répartition plus étendues dans l'hémisphère Sud.

Description de l'individu adulte

- Arbuste de 2 à 3 mètres.

- Description des feuilles

Feuilles simples, elliptiques de 3-7 x 1,5-3 cm, glabres, verticillées par trois, marge à dents assez larges dans la moitié supérieure et en coin à la base, à pétiole court (4-5 mm).

Jeunes rameaux et pétioles très finement pubescents.

Stipule elliptique de 0,5-0,9 cm, finement pubescente sur la face inférieure.

Vue d'un rameau foliaire de *Pancheria vieillardii* (©LIVE/UNC)

Vue d'un rameau avec inflorescences de *Pancheria vieillardii* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Infrutescences en têtes sphériques (1-1,3 cm de diamètre) avec 40 (±10) fruits, situées à l'aisselle des feuilles verticillées par 3, portées par un pédoncule finement pubescent de 1-1,2 cm.

Rameau avec infrutescence de *Pancheria vieillardii* (©LIVE/UNC)

Infrutescence de *Pancheria vieillardii* (©LIVE/UNC)

Fruits secs déhiscents à deux fentes s'ouvrant du haut vers le bas sur la moitié de la longueur à valve finement pubescente à poils apprimés peu nombreux.

Fruit de *Pancheria vieillardii* vu de face (©LIVE/UNC)

Fruit de *Pancheria vieillardii* vu de profil (©LIVE/UNC)

Distribution géographique

Distribution géographique de *Pancheria vieillardii*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Pancheria vieillardii est actuellement représentée sur une zone assez limitée de la côte est, près de la région de Canala.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec et à la lumière. Au bout d'une semaine, les semences sont détachées des fruits et triées.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 20,4 (± 0,29) mg,
soit 4900 (± 70) graines/g.

Techniques de conservation

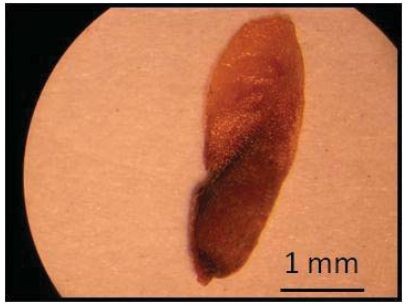
- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante et au sec pendant quelques mois (le taux de germination passe de 80 à 20% en 5 mois)

Description de la semence

1/ Structure externe :

La semence présente une forme grossièrement ovoïde, sa taille variant de 0,3-0,4 x 0,15-0,17 mm.

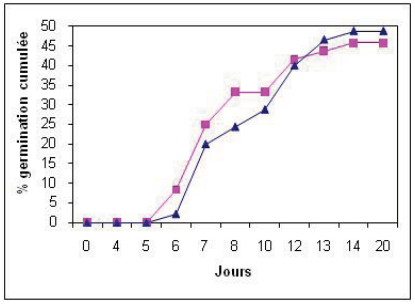
La graine présente une partie ailée importante occupant plus de la moitié de la surface, plate (rôle dans la dissémination par le vent) de couleur marron clair et une partie de forme ovale bombée, représentant l'embryon et les tissus nourriciers de couleur marron plus foncé occupant l'autre moitié de la graine.



Graine de *Pancheria vieillardii* observée à la loupe binoculaire (©LIVE/UNC)

Germination

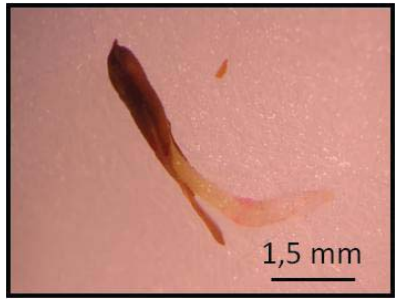
Du fait d'une faible quantité de graines, seule une expérience de germination a pu être menée à 25°C à l'obscurité ou à la lumière.



Graphique représentant le taux de germination des graines de *Pancheria vieillardii* en fonction du temps à 25°C à l'obscurité (▲) ou à la lumière continue (■).

Les résultats montrent une germination rapide dès le 6ème jour à la lumière ou à l'obscurité.

Quelle que soit l'expérience considérée, le taux maximal de germination atteint des valeurs proches de 50%. Il est à noter que la germination est quasi identique à la lumière et à l'obscurité.



Graine germée de *Pancheria vieillardii* (©LIVE/UNC)

Il est intéressant de noter que la zone de sortie de la radicule est située dans la partie médiane alors qu'elle l'est dans la partie basse pour les espèces du genre *Geissois*.

Remarque : Aucune autre étude spécifique n'a été à ce jour menée sur cette espèce faute de quantité suffisante.

Pittosporum simsonii

Famille

Pittosporaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 10 genres mais seul le genre *Pittosporum* est présent en Nouvelle-Calédonie. Le genre compte 45 espèces **toutes endémiques** à la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbre, arbuste ramifié pouvant atteindre de 15 à 20 m de hauteur.

Vue d'ensemble de *Pittosporum simsonii* (©D. & I. Létocart)

- Description des feuilles

Feuilles regroupées par 6-20 avec pétiole mesurant de 1 à 3,5cm. Limbe étroitement elliptique, un peu coriace à marge sinuée faiblement crénelé.

Feuilles de *Pittosporum simsonii* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

Les fleurs se présentent sur des inflorescences terminales (Glomérules) longues et bien fournies. Elles sont tubulaires et de taille importante et de couleur blanc crème. Elles sont parfumées.

Fleurs de *Pittosporum simsonii* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Fruits en capsules en 2 valves. Capsules lisses ou peu verruqueuses, ellipsoïdes. Les graines sont de couleurs noires dans une enveloppe collante plutôt nombreuses mais le nombre est variable.

Fruits de *Pittosporum simsonii* (©JJ. Villegente)

Habitat

Elle se développe aussi bien en forets denses humides, dans les formations para-forestières, qu'en maquis miniers. Elle s'installe préférentiellement sur des sols plus ou moins profonds issus de roches ultrabasiques.

Particularités

Les individus arborescents appartenant à cette espèce sont parmi les plus gros du genre *Pittosporum* en Nouvelle-Calédonie.

Distribution géographique

Largement répandue depuis 150 mètres jusqu'à 1200 mètres d'altitude. Elle est majoritairement présente sur des substrats ultramafiques.

Distribution géographique de *Pittosporum simsonii* d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- Floraison de septembre à novembre.

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

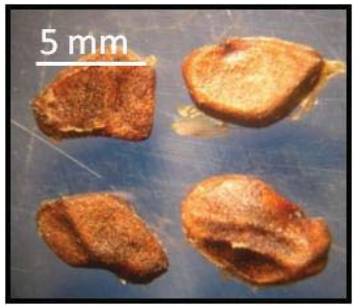
- Les fruits arrivent à maturité en août.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 1,564 (± 0,06) g, soit 63 (± 4) graines/g

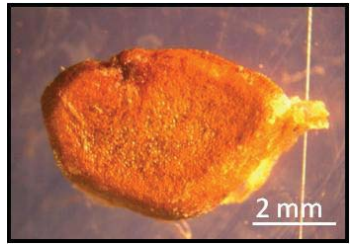
Description de la semence

1/ Structure externe :



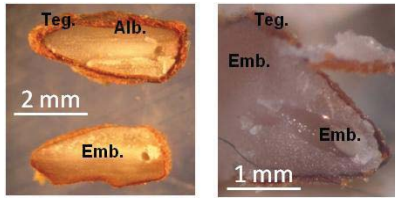
Graines de *Pittosporum simsonii* (©LIVE/UNC)

La taille des semences est de 0,4-0,5 x 0,2-0,3 cm pour 2 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme plutôt variable, avec des bords rectilignes. Elle est de couleur marron clair.



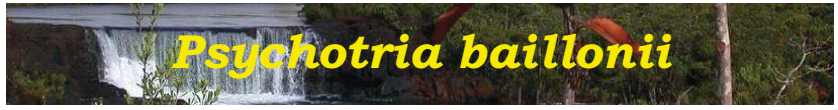
Graine entière de *Pittosporum simsonii* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne



Coupe longitudinale de *Pittosporum simsonii* (©LIVE/UNC)

Graine de type albuminé (observation d'un embryon (Emb.) blanc placé à une extrémité de la graine).
La dissection met en évidence une couche tégumentaire (Teg.) fine. L'albumen (Alb.) occupe une place importante. Ceci pourrait laisser à penser qu'il existe une dormance morphologique.



Famille

Rubiaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 232 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 211 sont endémiques, réparties sur 28 genres. Le genre *Psychotria* compte 86 espèces toutes endémiques à la Nouvelle-Calédonie dont une hyperaccumulatrice de nickel : *Psychotria douarrei*.

Description de l'individu adulte

- Arbuste de 1 à 5 m ramifié, tiges et rameaux grêles. Apex des tiges verts. Bois très cassant.

Plante entière de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

  Feuilles pétiolées et opposées de couleur verte foncées, brillantes sur le dessus et clair sous le dessous.

Feuilles et fruits de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

  Fleur blanche et petite, corolle blanche.

- Description du fruit

  Inflorescence terminale en panicule à pédoncules verts, fruits immatures verts, blancs à mauves à maturité, lisses et charnus à pyrènes grisâtres.

Fruits de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)

Habitat

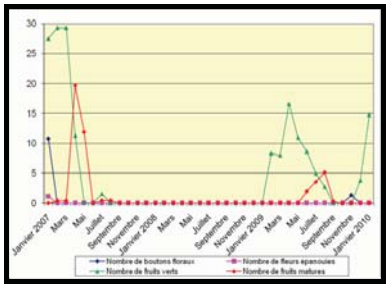
Elle se développe aussi bien en milieu ultramafique, que sur substrat non ultramafique. Elle évolue principalement en forêt dense humide, en lisière de forêt.

Distribution géographique

Localisée au nord de la « Grande Terre », ainsi que dans le sud.

Distribution géographique de *Psychotria baillonii*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie



- Floraison en janvier très courte
- Fructification principalement de novembre à février

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

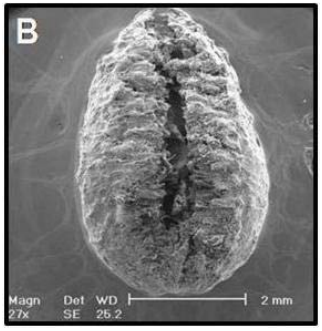
Description de la semence

1/ Structure du fruit :
La taille du fruit est de 0,4-0,6 x 0,8-1 cm. Le fruit présente une forme ronde.

Fruit de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)

Il est de couleur verte puis blanche à maturité. Il contient deux graines dans deux loges bien séparées.

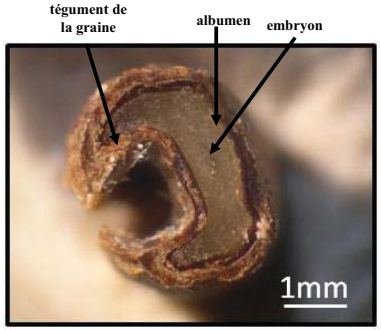
2/ Structure externe :
La taille des semences est de 2,12 x 5,45 mm pour 1,83 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme de losange bombée.
Elle est de couleur gris clair à gris foncé. Elle présente un aspect rugueux et est bombée sur le dessus. Le dessus est séparé en deux parties par une invagination peu profonde longitudinale. Un bout de la graine est plus large et l'autre coté plus étroit et pointu.



Face dorsale d'une graine de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

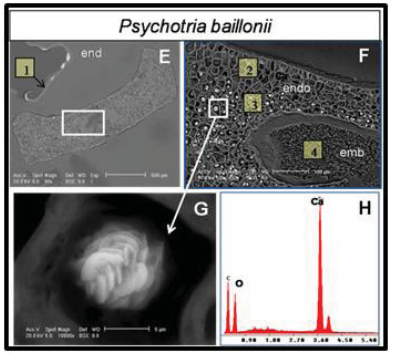
Graine de type albuminé (observation d'un embryon de très petite taille)



Coupe transversale d'une graine de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)

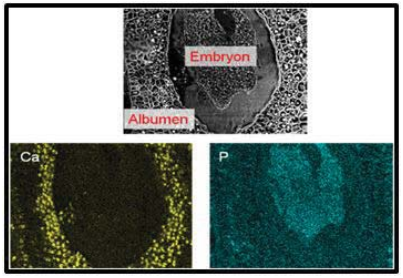
L'albumen occupe la plus grande partie de l'espace.
L'embryon blanc de très petite taille est placé au centre de l'albumen à une des extrémités de la graine.

4/ Ultrastructure

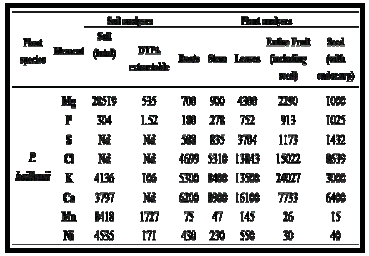


Ultrastructure de la semence de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)

L'analyse ultrastructurale de la semence de *P. baillonii* a permis de vérifier les observations effectuées plus haut concernant la structure de la semence. Cette analyse a permis aussi la mise en évidence de cristaux d'oxalate de calcium en forme de rose de sable et de prisme au niveau de la partie interne de l'albumen, proche de l'embryon.



Répartition des éléments minéraux au sein de la semence de *Psychotria baillonii* (©LIVE/UNC)



Plant species	Element	Soil (total)	DTPA-extractable	Roots	Stem	Leaves	Entire Fruit (including seed)	Seed (with endocarp)
P. baillonii	Mg	28519	535	700	900	4300	2200	1000
	P	304	1.52	180	270	752	913	1025
	S	Nd	Nd	580	835	3704	1173	1432
	Cl	Nd	Nd	4699	5310	13043	15022	8539
	K	4136	106	5300	8400	13928	24027	3002
	Ca	3797	Nd	6206	8000	16166	7753	6400
	Mn	1418	1727	75	47	145	26	15
	Ni	4535	171	450	230	558	30	40

Analyse des éléments minéraux dans les différentes parties de la plante de *Psychotria baillonii*

L'analyse de la quantité des éléments minéraux au sein des différentes parties de la plante montre une répartition qui se rapproche des espèces accumulatrices de nickel.

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

1,17 ± 0,21 mg/100mg de matière fraîche
1,31 ± 1,18 mg/100mg de matière sèche

Degré d'humidité des graines

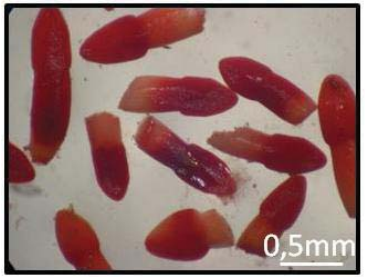
Taux d'hydratation de la graine :

- Graine entière :
  11 % (± 3,2).

Il s'agit donc d'une graine à tendance orthodoxe ou intermédiaire.

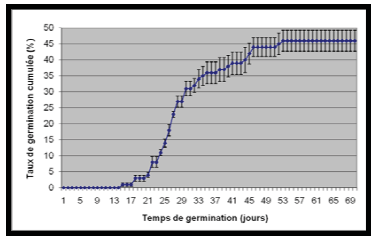
Viabilité du lot de semence

Un seul lot étudié avec une viabilité de 53 ± 13%.



Embryons viables de *P. baillonii* (©LIVE/UNC)

Germination



Taux de germination cumulé en fonction du temps de semences de *Psychotria baillonii* mises à germées à 25°C à la lumière avec endocarpe (♦)

La germination des semences de *P. baillonii* intervient après 16 jours de temps de latence pour une semence non traitée. La germination des semences de *P. baillonii* semble identique aux semences de *P. douarrei*, et ainsi, ces derniers semblent développer une dormance induite par les téguments des semences. Baskin et Baskin (2004) définissent ce type de dormance comme étant une Non-deep physiological dormancy.

Famille

Rubiaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 232 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 211 sont endémiques, réparties sur 28 genres. Le genre *Psychotria* compte 86 espèces toutes endémiques à la Nouvelle-Calédonie dont une hyperaccumulatrice de nickel : *Psychotria douarrei*.

Description de l'individu adulte

- Arbuste de 1 à 3 m ramifié, tiges et rameaux grêles. Apex des tiges verts. Bois très cassant.

Plante entière de *Psychotria douarrei* (©Jean Louis Ruiz)

- Description des feuilles

  Feuilles gaufrées pétiolées et opposées de couleur verte foncée, brillantes dessus et clair le dessous.

Feuilles et fruits de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur
  Fleur rose à corolle tubulaire et boutons floraux rose, intérieure des corolles blanches et extérieur des pétioles rougeâtres.

Fleurs de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit
  Inflorescence terminale en panicule à pédoncules verts, fruits immatures vert, blanc à mauve à maturité, lisse et charnue à pyrènes grisâtre.

Fruits de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

Habitat

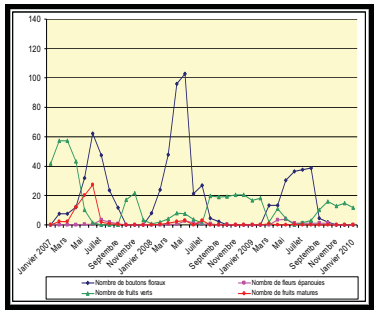
Elle se développe en milieu ultramafique, en forêt dense humide, en lisière de forêt.

Distribution géographique

Localisé au nord de la « Grande Terre », ainsi que dans le sud.

Distribution géographique de *Psychotria douarrei*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie



- Floraison de février à novembre
- Fructification principalement de juillet à mars

Techniques de conservation

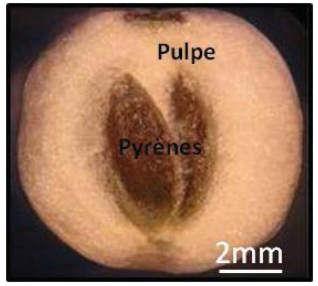
- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

Description de la semence

1/ Structure du fruit :
La taille du fruit est de 0,4-0,6 x 0,8-1,5 cm. Le fruit présente une forme ronde.

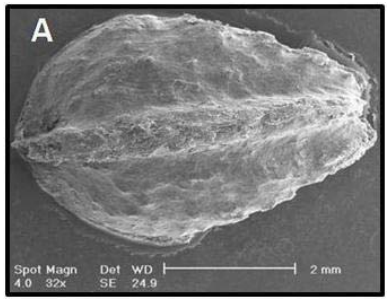
Fruit de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

Il est de couleur verte puis blanche ou mauve foncée à maturité avec un aspect luisant et lisse. Elle contient deux semences dans deux loges bien séparées.



Coupe transversale du fruit de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

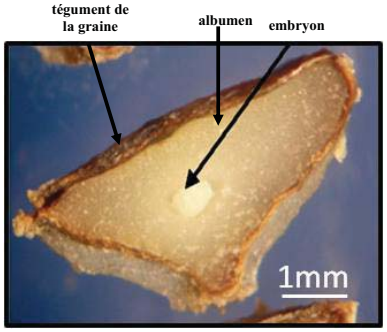
2/ Structure externe :
La taille des semences est de 4,75 x 7 mm pour 2,24 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme de losange et est bombée.
Elle est de couleur gris clair à gris foncé. Elle présente un aspect rugueux sur le dessus. Le dessus est séparé en deux parties par une crête longitudinale. Un bout de la graine est plus large et l'autre coté plus étroit et pointu.



Face dorsale d'une graine de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine de type albuminé (observation d'un embryon de très petite taille)



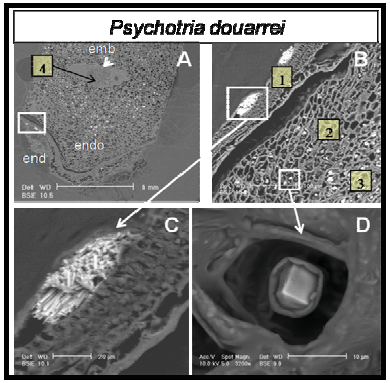
Coupe transversale d'une graine de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

L'albumen blanchâtre occupe la plus grande partie de l'espace.
L'embryon blanc de très petite taille est placé au centre de la graine.

4/ Ultrastructure

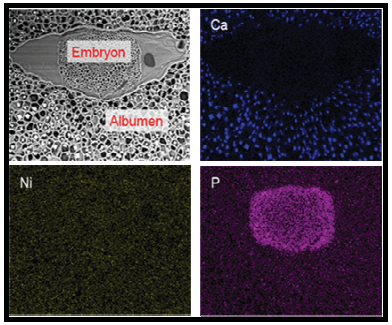
L'analyse ultrastructurale de la semence de *P. douarrei* a permis de vérifier les observations effectuées plus haut concernant la structure de la semence.

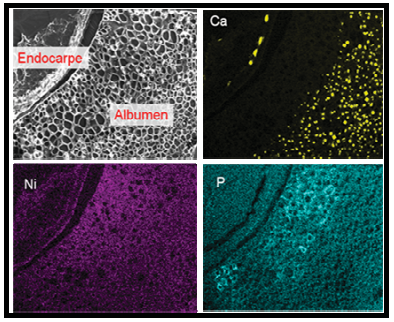
Cette analyse a permis aussi la mise en évidence de cristaux d'oxalate de calcium en forme de raphides au niveau de l'endocarpe ainsi que des cristaux d'oxalate de calcium en forme de primes ou de roses de sable au sein de l'albumen.



Ultrastructure de la semence de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

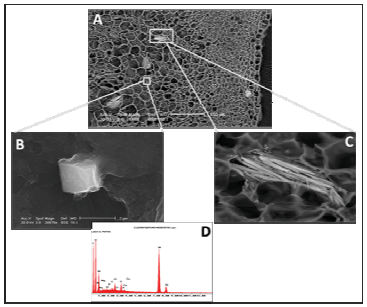
Cette analyse a aussi permis la mise en évidence d'une zonation particulière au sein de l'albumen entre des cristaux de calcium concentrés dans la partie interne de l'albumen et une zone riche en nickel localisée dans la partie externe de l'albumen. L'analyse de la répartition du nickel au sein du fruit montre un gradient décroissant de la partie extérieur du fruit à l'embryon de la graine.





Répartition des éléments minéraux au sein de la semence de *Psychotria douarrei* (©LIVE/UNC)

L'analyse ultrastructurale a également permis la mise en évidence de cristaux inédits de sel de nickel localisés principalement dans la pulpe du fruit ainsi que dans le tégument de la graine.



Occurrence de cristaux de sel de nickel dans la pulpe de *P. douarrei* ainsi que des raphides de cristaux d'oxalate de calcium (©LIVE/UNC)

Plant species	Element	Soil analyses: Soil (total)	Soil analyses: DTPA extractable	Plant analyses: Roots	Plant analyses: Stem	Plant analyses: Leaves	Plant analyses: Entire Fruit (including seed)	Plant analyses: Seed (with endocarp)
P. douarrei	Mg	29867	588	300	600	2300	1990	1600
	P	342	1.61	108	169	453	926	1141
	S	Nd	Nd	827	941	2274	2404	2181
	Cl	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	19299	8190
	K	3634	98	2700	5600	10200	18508	7500
	Ca	5003	Nd	3500	4800	14300	11356	11700
	Mn	9760	1832	402	65	646	469	542
	Ni	4894	162	3084	9813	18587	14048	9360

Analyse des éléments minéraux dans les différentes parties de la plante de *P. douarrei* (©LIVE/UNC)

L'analyse de la quantité des éléments minéraux au sein des différentes parties de la plante montre une répartition typique de celle obtenue pour des espèces hyperaccumulatrices de nickel.

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

7,62 ± 0,55 mg/100mg de matière fraîche
8,87 ± 0,63 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

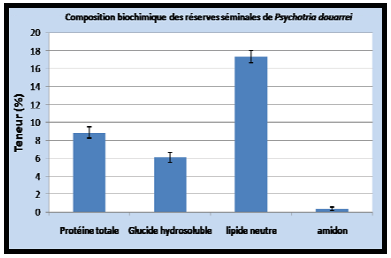
5,22 ± 0,45 mg/100mg de matière fraîche
6,07 ± 0,52 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

14,88 ± 0,57 mg/100mg de matière fraîche
17,30 ± 0,66 mg/100mg de matière sèche

- Composition brute en amidon

0,32 ± 0,17 mg/100mg de matière fraîche
0,37 ± 0,21 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :

Acides gras saturés	Palmitique (C16:0)	4,21%
	Stéarique (C18:0)	0,91%
Acides gras insaturés	Palmitoléique (C16:1Δ9)	Tr
	Oléique (C18:1Δ9)	7,35%
	Vaccénique (C18:1Δ11)	1,01%
	Linoléique (C18:2Δ9,12)	27,62%
Total des acides gras identifiés		41,10%
Acide gras 1 non identifié		55,99%
Acide gras 1 non identifié		2,86%

L'analyse des acides gras met évidence la présence d'une grande majorité d'acides gras insaturés. Cependant, deux acides gras non identifiés sont encore en cours d'étude.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine entière :
  15,5 % (+/- 3,2).

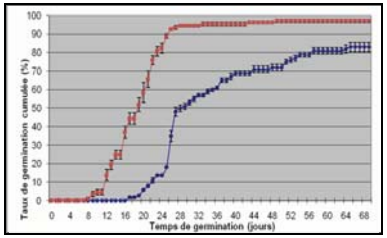
Il s'agit donc d'une graine à tendance orthodoxe ou intermédiaire.

Viabilité du lot de semence

Un seul lot étudié avec une viabilité de 97 ± 6%.

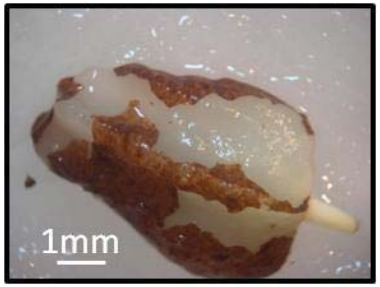
Embryons viables de *P. douarrei* (©LIVE/UNC)

Germination



Taux de germination cumulé en fonction du temps de semences de *Psychotria douarrei* mises à germées à 25°C à la lumière avec (♦) ou sans endocarpe (■).

La germination des semences de *P. douarrei* intervient après 8 jours quand l'endocarpe est ôté comparé à 16 jours de temps de latence pour une semence non traitée. Le plateau est aussi atteint rapidement si l'on considère les semences débarrassée de leur endocarpe. Ainsi, les semences de *P. douarrei* sont définies comme étant des semences à dormance induite par les téguments de la semence. Baskin et Baskin (2004) définissent cette dormance comme étant une Non-deep physiological dormancy.



Graine de *P. douarrei* germée (©LIVE/UNC)

Psychotria oleoides

Famille

Rubiaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 232 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 211 sont endémiques, réparties sur 28 genres. Le genre *Psychotria* compte 86 espèces toutes endémiques à la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbuste multicaule de 1 à 3m ramifié, tiges et rameaux épais légèrement succulents. Bois très cassant.

Plante entière de *Psychotria oleoides* (©D. & I. Létocart)

- Description des feuilles
  Feuilles de couleur vert foncé brillantes dessus et clair en dessous.

Feuilles de *Psychotria oleoides* (©D. & I. Létocart)

- Description de la fleur

  Fleur blanche et boutons floraux verts, pétioles rougeâtres. Calice blanc et corolle blanc verdâtre.

- Description du fruit

  Infrutescences à pédoncules bruns, Fruits immatures vert, orangés rugueux et à maturité lisses et charnues à pyrènes rouge vif.

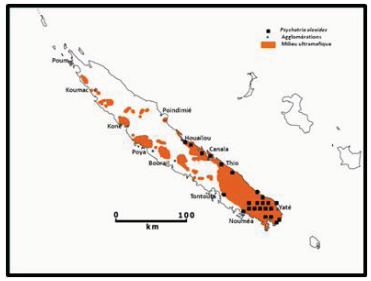
Fruits de *Psychotria oleoides* (©R. Amice)

Habitat

Elle se développe aussi bien en zone ouverte ultramafique, en forêt dense de moyenne et haute altitude, en lisière de foret, qu'en zone paraforestière sur alluvions. Elle s'installe préférentiellement sur des substrats ferralitiques ou sur des terrains serpentiniques.

Distribution géographique

Largement répandue au sud de la Grande Terre, entre 50 et 1000 mètres d'altitude.



Distribution géographique de *Psychotria oleoides*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

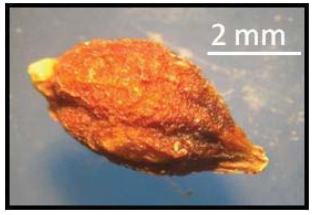
- Floraison de novembre à janvier
- Fructification principalement de novembre à mars

Techniques de conservation

- A température ambiante au sec pendant plusieurs mois
- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

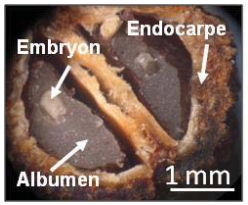
Description de la semence

1/ Structure du fruit :
La taille du fruit est de 0,5-0,6 x 0,4-0,5 cm pour 3 mm d'épaisseur. Le fruit présente une forme ovale avec deux pointes aux extrémités.



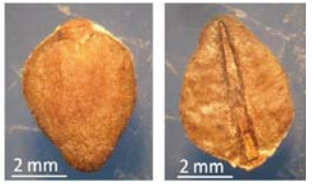
Fruit de *Psychotria oleoides* (©LIVE/UNC)

Elle est de couleur marron foncé avec un aspect rugueux. Elle contient deux graines dans deux loges bien séparées.



Coupe transversale du fruit de *Psychotria oleoides* (©LIVE/UNC)

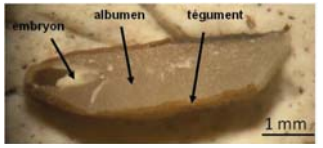
2/ Structure externe :
La taille des semences est de 0,3-0,5 x 0,3-0,4 cm pour 0,1 cm d'épaisseur. Cette graine présente une forme de losange bombé. Elle est de couleur marron clair à marron foncé. Elle présente un aspect lisse bombée sur le dessus. Le dessous est séparé en deux parties par un trait longitudinal plus foncé. Un bout de la graine est plus large et aplati et un autre coté plus étroit et pointu.



Face ventrale (à droite) et dorsale (à gauche) d'une graine de *Psychotria oleoides* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine de type albuminé (observation d'un embryon de très petite taille).



Coupe longitudinale d'une graine de *Psychotria oleoides* (©LIVE/UNC)

L'albumen blanchâtre occupe la plus grande partie de l'espace. L'embryon blanc de très petite taille est placé à l'extrémité pointue de la graine.

Famille

Myrsinaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 55 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 54 sont endémiques, réparties sur 3 genres. Le genre *Rapanea* compte 14 espèces dont 13 sont endémiques de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbrisseau ou arbuste de 0,5 à 2m de haut assez dense en boule à port terminal

Herbier de *Rapanea diminuta* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

  Les feuilles sont de petites tailles de forme obovale, rétuses de 0,5 à 1,5cm.

- Description de la fleur

  Les fleurs axillaires sont de couleurs brunes. Les fleurs femelles sont blanches verdâtres à dessins rouges.

- Description du fruit

  Les fruits ronds sont rayés et violets à maturité.

Habitat

Elle se développe aussi bien en maquis ligno-herbacé, sur crêtes à *Araucaria*, en forêt dense nepheliphile avec de forte pente ou fourré altimontain, sommital. Elle s'installe préférentiellement sur sol gravillonaire, hypermagnésien, sur terrain serpentinique, sur croûte de calcaire et argile noire.

Distribution géographique

Répandue sur toute la « Grande Terre », depuis 30 mètres et jusqu'à 1638 mètres d'altitude.

Distribution géographique de *Rapanea diminuta*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- Floraison principalement de mai à septembre
- Fructification principalement de juillet à décembre.

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

- De juin à décembre
- Récolte des fruits mauves ou violets

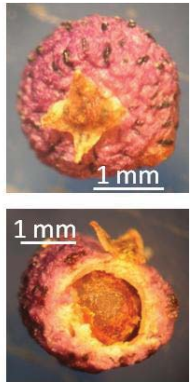
Données quantitatives

Poids de 100 fruits : 1,1293 (± 0,05) g, soit 88 (± 5) fruits/g.

Description de la semence

1/ Structure du fruit :

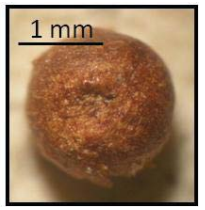
Dans un fruit se trouve une graine. Le fruit à maturité est mauve. Il mesure 0,2-0,3 x 0,2-0,3 cm pour 2 mm d'épaisseur.



Fruit de *Rapanea diminuta* entier ou coupé (graine visible) (©LIVE/UNC)

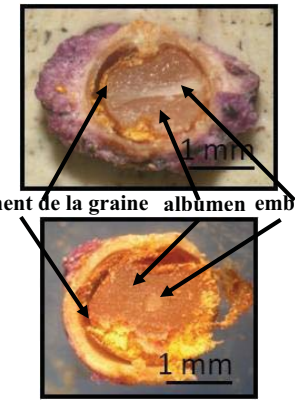
2/ Structure externe :

La taille des semences est de 0,1-0,2 x 0,1-0,2 cm pour 1 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ronde. Elle est marron clair.



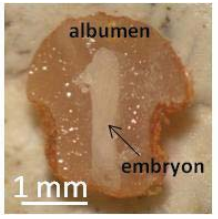
Graine de *Rapanea diminuta* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne



Coupe longitudinale du fruit (en haut) et transversale (en bas) de *Rapanea diminuta* (©LIVE/UNC)

La dissection montre une couche tégumentaire fine. La graine est de type albuminé (observation d'un embryon opaque placé au milieu du tissu nourricier). L'embryon blanc est axile, c'est-à-dire que celui-ci est placé dans l'axe de la graine. L'albumen occupe les trois quarts de l'espace.



Coupe longitudinale de la graine de *Rapanea diminuta* (©LIVE/UNC)

Scaevola cylindrica

Famille

Goodeniaceae

Généralités sur la famille

La famille comprend en Nouvelle-Calédonie un seul genre, *Scaevola*, représenté par 9 espèces dont 6 sont endémiques.

Ailleurs dans le monde, la famille comprend 14 genres pour 300 espèces, surtout dans les régions sèches.

Le genre *Scaevola* ailleurs comprend 130 espèces surtout présentes en Australie avec 2 exceptions : 1 espèce sur les littoraux atlantiques et l'autre sur les littoraux pacifiques.

Description de l'individu adulte

- Arbuste ou arbre de 8 m à cime arrondie; ramification peu dense.

Pied adulte de *Scaevola cylindrica in situ* (©JL. Ruiz)

- Description des feuilles

Feuilles pétiolées, papyracées, étroitement elliptiques, glabre ou finement pubescentes; bord entier ou denté dans la moitié supérieure ; marge révolutée.

Feuillage et fruits *Scaevola cylindrica* (©JL. Ruiz)

- Description des fleurs

Fleurs blanches sur des inflorescences axillaires, lâches, concentrées au sommet des axes.

- Description du fruit

Fruits ronds de type baie, noirs et brillants à maturité ; noyau à surface verruqueuse contenant 2 graines aplaties.

Fruits de *Scaevola cylindrica* (©JL. Ruiz)

Habitat

On retrouve l'espèce en maquis arbustif, en lisière de forêt humide et en zones secondarisées (comme espèce cicatricielle).

Elle pousse sur sol plus ou moins profond d'origine ultrabasique ou sédimentaire, plus rarement sur calcaire.

Distribution géographique

Largement répandue entre 50 et 1000 mètres sur la « Grande Terre » et à l'Ile des Pins.

Distribution géographique de *Scaevola cylindrica*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Technique et conseil de récolte

Floraison et fructification sur l'ensemble de l'année.

Extraction et conditionnement des graines

Les fruits peuvent être séchés pour être conservés. Pour l'extraction des graines, les fruits sont mis à tremper pendant une longue période pour permettre le pourrissement de la partie charnue.

Les semences sont récupérées par la suite.

Données quantitatives

Poids de 100 fruits secs : 3,33 (± 3,33) g, soit environ 30 (± 1) fruits secs/g.

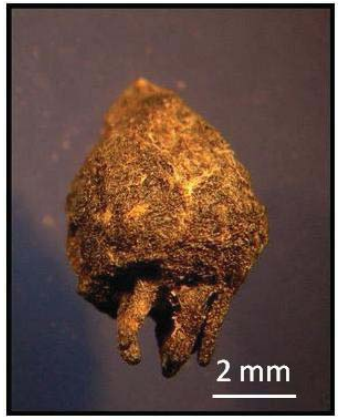
Techniques de conservation

Les fruits sont généralement conservés à température ambiante au sec. Cependant, pour des conservations sur du long terme, il est préférable de conserver les fruits au froid sec, à 4°C.

Description de la semence

1/ Structure externe :

- Le fruit :
Il présente une taille de 0,4-0,6 x 0,3-0,4 cm, une forme ronde à ovoïde, noir, de toucher rugueux. Il contient deux graines.

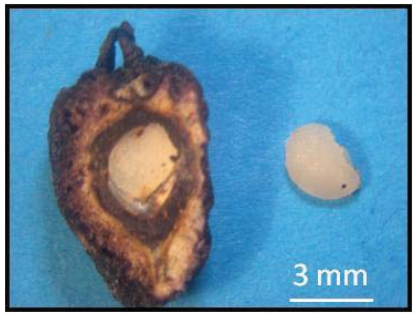


Fruit en gros plan de *Scaevola cylindrica*(©LIVE/UNC)

Les graines dans le fruit de *Scaevola cylindrica* (©LIVE/UNC)

- La graine :

Elle présente une forme ronde à ovoïde, de couleur blanche et de taille variant de 0,2 à 0,4 cm.

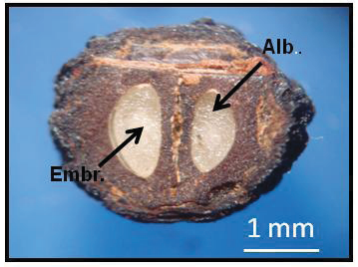


Un fruit disséqué et une graine extraite de *Scaevola cylindrica* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

Les coupes transversales et longitudinales nous permettent de distinguer dans le fruit un péricarpe très épais constitué de 2 couches, la plus dure et épaisse étant la couche interne (endocarpe). Les 2 graines de type albuminé (embryon et tissus de réserve ayant subsisté) sont contenues dans 2 loges distinctes, entourées d'une pulpe noire fibreuse.

La structure du fruit montre donc un péricarpe épais rendant l'accessibilité à l'eau difficile pour la semence et impliquant une dégradation de ces tissus en milieu naturel.



Coupe transversale d'un fruit de *Scaevola cylindrica* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé 14.2004 et directement sur le fruit :

- *Composition brute en protéines*

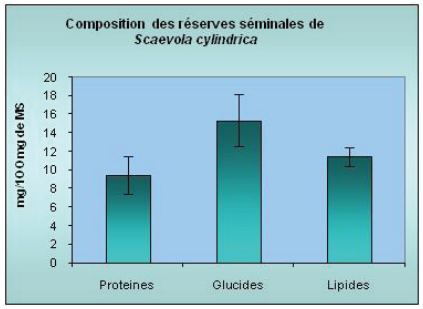
8,19 ± 1,77 mg/100mg de matière fraîche
9,46 ± 2,05 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

13,26 ± 2,42 mg/100mg de matière fraîche
15,32 ± 2,80 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

9,87 ± 0,84 mg/100mg de matière fraîche
11,41 ± 0,97 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides neutres :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids	(+/- SE)
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	8,33	0,32
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	3,75	0,23
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	26,58	0,21
C 18:1Δ11	cis-11-Octadecanoic	Vaccenic	0,90	0,04
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	57,50	2,88
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	1,82	0,02
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,21	0,02
C 22:0	Docosanoic	Behenic	0,14	0,00
C 24:0	Tetracosanoic	Lignoceric	0,10	0,01
C 24:1Δ15	cis-15-Tetracosenoic	Nervonic	0,09	0,08
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			99,42	3,55

L'analyse de la composition en acide gras montre une prédominance des acides gras insaturés (plus de 70% du total des acides gras). Il est à noter qu'une faible quantité d'acides gras présents en trace n'a pu être identifiée. Ceux-ci sont en cours d'étude.

Degré d'humidité du fruit entier

- Fruit entier :
  11,85 % (±0.26).
- Fruit entier en poudre:
  13,47 % (± 0.38).

Il s'agit d'une semence orthodoxe ou intermédiaire.

Viabilité du lot de semence

D'après le test au chlorure de tétrazolium, 81±2 embryons sont viables sur 100 fruits.

Germination

L'étude de l'influence de différents traitements a été réalisée. Ces traitements sont :
-Eau chaude : 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C
-Eau bouillante : 1, 2, 5 min
-H_2SO_4 98% dilué au ¼ : 1, 5 ,10 min
-Scarification au papier de verre
-Eau fumigée : 6, 12, 24h après scarification au papier de verre.

Aucune germination n'a été notée après 40 jours d'observation.

Scaevola montana

Famille

Goodeniaceae

Généralités sur la famille

La famille comprend en Nouvelle-Calédonie un seul genre, *Scaevola*, représenté par 9 espèces dont 6 sont endémiques.

Ailleurs dans le monde, la famille comprend 14 genres pour 300 espèces, surtout dans les régions sèches.

Le genre *Scaevola* ailleurs comprend 130 espèces surtout présentes en Australie avec 2 exceptions : 1 espèce sur les littoraux atlantiques et l'autre sur les littoraux pacifiques.

Description de l'individu adulte

- Arbrisseau dressé ou arbuste à port parfois buissonnant de 0,5-2 m

Pied adulte de *Scaevola montana in situ* (©G. Gateblé)

- Description des feuilles

Feuilles pétiolées, papyracées, étroitement elliptiques, arrondies au sommet, en coin à la base, glabres ou finement pubescentes; bord entier ou denté dans la moitié supérieure; marge révolutée.

Feuillage et fleurs de *Scaevola montana* (©A. Olivier)

- Description des fleurs

Fleurs blanches sur des inflorescences axillaires, lâches, concentrées au sommet des axes.

- Description du fruit

Fruits ronds de type baie, noirs et brillants à maturité ; noyau à surface ondulée contenant 2 graines aplaties.

Fruits immatures de *Scaevola montana* (©A. Olivier)

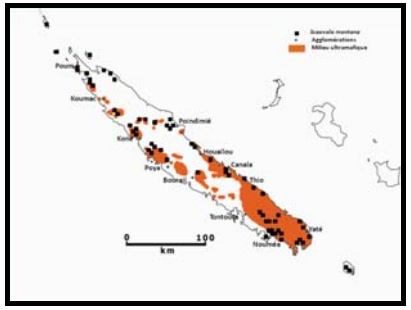
Habitat

On retrouve l'espèce dans le maquis ligno-herbacé; les fourrés denses en milieu humide ou sclérophylle.

Elle pousse sur les sols magnésiens ou volcano-sédimentaires, plus rarement sur croûtes calcaires.

Distribution géographique

Très répandue entre 50 et 1000 mètres : sur la « Grande Terre », l'Ile des Pins, les Iles Belep et l'Ilot Balabio.



Distribution géographique de *Scaevola montana*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

Floraison et fructification sur l'ensemble de l'année.

Extraction et conditionnement des graines

Les fruits peuvent être séchés pour être conservés. Pour l'extraction des graines, les fruits sont mis à tremper pendant une longue période pour permettre le pourrissement de la partie charnue.
Les semences sont récupérées par la suite.

Données quantitatives

Poids de 100 fruits secs : 2,12 (± 0,16) g,
soit environ 47 (± 7) fruits secs/g.

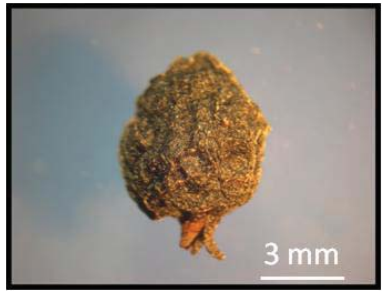
Techniques de conservation

Les fruits sont généralement conservés à température ambiante au sec. Cependant, pour des conservations sur du long terme, il est préférable de conserver les fruits au froid sec, à 4°C.

Description de la semence

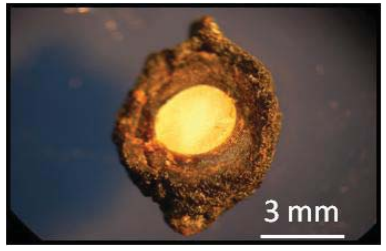
1/ Structure externe :

- Le fruit :
Il est noir, de forme ronde à ovoïde, avec une taille de 3-4 x 4-6 mm. Il est rugueux au toucher et renferme 2 graines.



Fruit de *Scaevola montana* en gros plan (©LIVE/UNC)

- La graine :
Elle est comme le fruit de forme ronde à ovoïde, de couleur blanche et présente une taille d'environ de 2 mm.

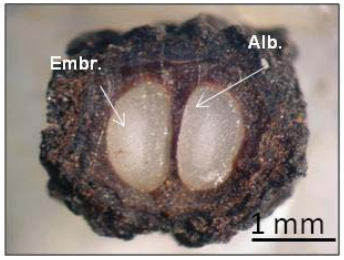


Fruit de *Scaevola montana* en coupe longitudinale (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

Les coupes transversales et longitudinales nous permettent de distinguer dans le fruit un péricarpe très épais constitué de 2 couches, la plus dure et épaisse étant la couche interne (endocarpe). Les 2 graines de type albuminées (embryon et tissus de réserve ayant subsisté) sont contenues dans 2 loges distinctes, entourées d'une pulpe noire fibreuse.

La structure du fruit montre donc un péricarpe épais rendant l'accessibilité à l'eau difficile pour la semence et impliquant une dégradation de ces tissus en milieu naturel.



Coupe transversale d'un fruit de *Scaevola montana* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

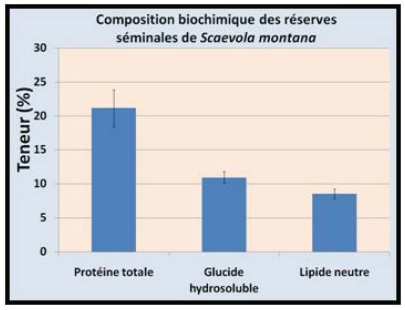
14,06 ± 1,79 mg/100mg de matière fraîche
21,16 ± 2,70 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

7,28 ± 0,56 mg/100mg de matière fraîche
10,95 ± 0,85 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

7,54 ± 0,62 mg/100mg de matière fraîche
8,55 ± 0,70 mg/100mg de matière sèche



L'analyse de la composition biochimique des réserves séminales révèle une prédominance de la fraction proteique (21,16%) suivi par la fraction glucidique avec 10,95%. La semence est donc une semence de type protéagineuse.

Taux d'hydratation

- Fruit entier : 11,82 %.

Viabilité du lot de semence

D'après le test au chlorure de tétrazolium, 54 ± 2 embryons sont viables sur 100 fruits.

Germination

L'étude de l'influence de différents traitements a été réalisée. Ces traitements sont :
-Eau chaude : 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C
-Eau bouillante : 1, 2, 5 min
-H_2SO_4 98% dilué au ¼ : 1, 5, 10 min
-Scarification au papier de verre
-Eau fumigée : 6, 12, 24h après scarification au papier de verre
-Pourrissement pendant 2 mois à l'air libre dans de l'eau à température ambiante

Aucune germination n'a été notée après 40 jours d'observation.

Famille

Cyperaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie, 98 espèces réparties sur 25 genres dont 35 endémiques.

Sur 33 espèces des maquis miniers dont 27 endémiques de la Nouvelle-Calédonie, seulement 6 se réinstallent progressivement sur les mines dégradées ou dénudées : *Costularia comosa*, *C. pubescens*, *Baumea deplanchei*, *Schoenus neocaledonicus*, *S. juvenis* et *Lepidosperma perteres*.

Le genre *Schoenus* compte 6 espèces dont 4 endémiques.

Sur les massifs ultramafiques, les Cyperaceae constituent la principale composante de la flore herbacée.

Description de l'individu adulte

- Plante herbacée se développant en touffes pouvant être de grandes tailles.

Touffe de *Schoenus neocaledonicus* (©JL. Ruiz)

- Description des feuilles

Limbes plats, relativement courts et étroits (15 à 30 cm de haut et 2 à 4mm de large), dressés et terminant par une pointe.

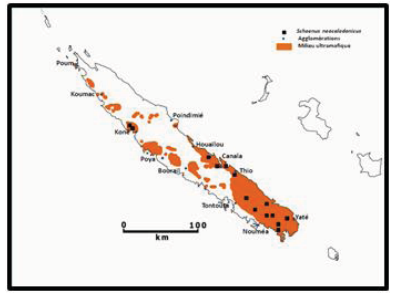
- Description du fruit

Les fruits sont secs indéhiscents de type achènes. Achènes arrondis à soies légèrement plumeuses à la base.

Habitat

On retrouve cette espèce principalement sur les maquis miniers, sur sols issus de roches ultramafiques, de 50 à 1200 mètres d'altitude.

Distribution géographique



Distribution géographique de *Schoenus neocaledonicus*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009

Technique et conseil de récolte

Scheonus neocaledonicus fleurit de septembre à mars et fructifie de novembre à avril cependant la fructification est plus abondante de décembre à février.
Les graines peuvent être récoltées dés janvier- février, dés qu'elles commencent à sortir des épillets.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec sous des néons ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage. La difficulté réside dans le tri des semences et des débris des épis.

Données quantitatives

Poids de 100 fruits : 52,14 (± 1,4) mg,
soit environ 1918 (± 48) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable à 15°C sous gel de silice (11-12% d'humidité).

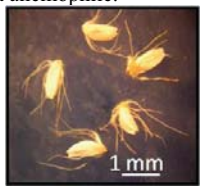
Particularités biologiques

Plante très résistante à la sécheresse

Description de la semence

1/ Structure externe :

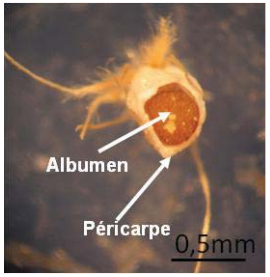
Il faut bien admettre que cette description est basée sur le fruit puisqu'il s'agit d'un achène.
Fruit de 1 à 3 mm de longueur et 0,5 à 1 mm de largeur. De forme longitudinale à 3 faces. Elle présente une couleur blanche à beige. Elle est ornementée d'une couronne d'appendices beiges foncés soyeux au nombre de 6, insérée à la base de la graine. Les soies sont un peu plus nombreuses et longues sur le premier tiers des appendices qui mesurent entre 0,4 et 1 cm. On peut penser que le mode de dissémination des graines est anémophile.



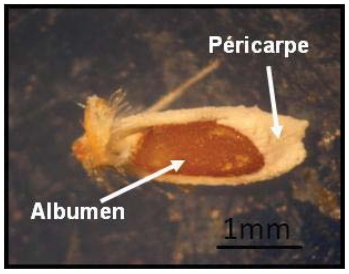
Graines de *Schoenus neocaledonicus* (©LIVE/UNC)

Graine de *Schoenus neocaledonicus* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne



Coupe transversale du fruit de *Schoenus neocaledonicus* (©LIVE/UNC)



Coupe longitudinale du fruit de *Schoenus neocaledonicus* (©LIVE/UNC)

Le fruit présente un tégument externe beige clair très fragile. Un tissu nourricier de couleur marron qui occupe les ¾ de la semence entoure un embryon marron foncé, très fin et difficilement visible à l'œil nu.
La graine est donc de type albuminé.

Famille

Mimosaceae (Légumineuse)

Généralités sur la famille

La famille comporte 20 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 15 sont endémiques, réparties sur 7 genres. Le genre *Serianthes* compte 6 espèces **toutes endémiques** de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Grand arbre pouvant atteindre 30 m.

Arbre en fruit de *Serianthes sachetae* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

Feuilles composées paripennées avec 6-18 paires de folioles asymétriques, alternes. Folioles pennées alternes mesurant de 4 à 13cm. Foliolules oblongues entières.

Feuille de *Serianthes sachetae* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

Fleurs blanches avec des grandes étamines blanches à la base, rosées vers l'extrémité. Fleurs groupées par 2 ou 3 à l'extrémité du pédoncule. Inflorescence en panicule.

Arbre en fleur de *Serianthes sachetae* (©D. & I. Létocart)

- Description du fruit

Fruits en gousses de 16-25 x 4-7 cm. Les gousses ligneuses sont couvertes d'un tomentum dense de teinte brune.

Habitat

Elle se développe dans les forêts littorales ou humides de basse et moyenne altitude (jusqu'à 400m d'altitude) et plus rarement dans le maquis. Elle s'installe sur des substrats de nature indifférente : ultramafique, schisteux ou calcaire.

Distribution géographique

Cette espèce est largement distribuée à travers la « Grande Terre », plus rarement à l'Ile des Pins et à Maré.

Distribution géographique de *Serianthes sachetae*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD(NOU)

Phénologie

- Floraison principalement d'octobre à juillet.
- Fructification étalée de mars à novembre.

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

- De mars à novembre.
- Récolte des gousses lorsque les graines à l'intérieur sont bien dures et gonflées.

Technique et conseil de récolte

- Au sécateur
- Par gousse entière

Extraction et conditionnement des graines

La meilleure technique d'extraction des graines est d'ouvrir les gousses à l'aide d'un sécateur et d'en extraire les graines.

Données quantitatives

Poids de 50 graines : 13,93 (± 0,79) g, soit 3 (± 1) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation au froid (4°C au froid sec)

Description de la semence

1/ Structure du fruit :

Dans une gousse se retrouvent plusieurs graines.

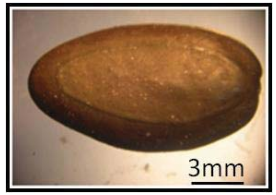
Fruits de *Serianthes sachetae* (©B. Suprin)

2/ Structure externe :

Graines de *Serianthes sachetae* (©LIVE/UNC)

La taille des semences est de 1,2-1,4 x 0,7-0,9 cm pour 3 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ovale plutôt aplatie, avec une extrémité plus rectiligne que l'autre (coté de la graine d'où l'embryon sort).

Elle présente une couleur marron clair en extrémité et de couleur verdâtre plus au centre de la graine. Elle a un aspect lisse et luisant.

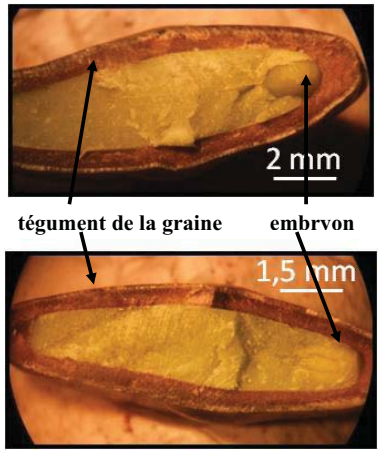


Face ventrale d'une graine de *Serianthes sachetae* (©LIVE/UNC)

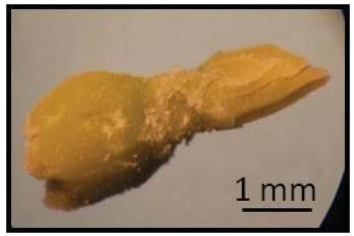
Face dorsale d'une graine de *Serianthes sachetae* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine de type exalbuminé



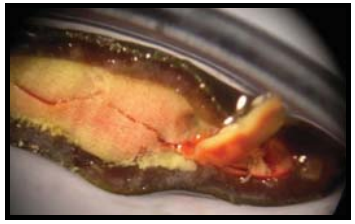
Coupe longitudinale (en haut) et transversale (en bas) de *Serianthes sachetae* (©LIVE/UNC)



Embryon extrait de la graine de *Serianthes sachetae* (©LIVE/UNC)

La dissection met en évidence une couche tégumentaire épaisse.

On observe que les tissus de réserves sont verts, ainsi que l'embryon.



Graine de *Serianthes sachetae* après coloration au chlorure de tétrazolium (©LIVE/UNC)

Germination

Le nombre insuffisant de graines de *Serianthes sachetae* n'a pas permis de lancer des expérimentations de germination. Cependant, sur une dizaine de semences disponibles, une scarification au scalpel a permis une bonne germination de ces dernières. En effet, toutes les semences ont pu germer après avoir été scarifiées.

Stenocarpus milneii

Famille

Proteaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 43 espèces **toutes endémiques** réparties sur 9 genres dont 6 endémiques : *Beauprea, Beaupreopsis, Eucarpha, Garnieria, Kermadecia, Sleumerodendron* ; 2 genres subendémiques : *Vitoria* et *Macadamia* ; 1 genre Australien : *Grevillea* et 1 genre Australo-Papou : *Stenocarpus*.

Il s'agit d'arbrisseaux, d'arbustes ou parfois de grands arbres, plus rarement des plantes herbacées.
Le genre *Stenocarpus* compte en Nouvelle-Calédonie, 12 espèces toutes endémiques. Il s'agit d'arbres ou d'arbustes.

Description de l'individu adulte

- Port de l'arbre

Arbuste ou petit arbre pouvant atteindre 10 m; rameaux âgés arrondis avec les extrémités velues, un peu aplatis; écorce grise couverte de lenticelles.

.

Pied adulte *in situ* de *Stenocarpus milneii*
(©JL. Ruiz)

- Description des feuilles

Feuilles entièrement et profondément découpées, plus rarement simples, raides et coriaces, dressées, pâles dessous, les jeunes feuilles sont peu velues, les adultes glabres; les marges sont épaissies et un peu ondulées; les nervures sont à peine visibles; pétiole long de 5 - 10 mm.

Feuillage de *Stenocarpus milneii*
(©D. et I. Létocart)

- Description de la fleur

Fleurs blanches, jaune pâle ou foncé, rougeâtres ou rouge vif (2-10 par ombelle) avec des pédicelles glabres, filiformes sur des inflorescences bien plus courtes que les feuilles, isolées ou groupées par 4 sur des axes courts velus ou glabres. Floraison et fructification étalées sur l'ensemble de l'année.

Fleurs de *Stenocarpus milneii*
(©JL. Ruiz)

- Description du fruit

Follicules 25-120 x 2- mm, glabres, noirâtres à maturité.

Fruits immatures de *Stenocarpus milneii*
(©JL. Ruiz)

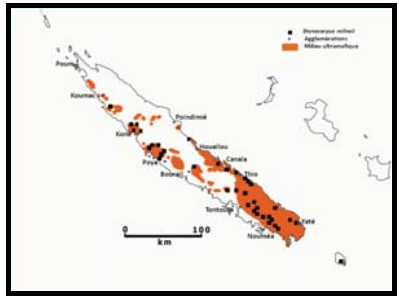
Fruits matures de *Stenocarpus milneii*
(©JL. Ruiz)

Habitat

Cette espèce est présente dans le maquis et les formations paraforestières. Elle se trouve au niveau des sols hypermagnésiens ou ferrallitiques, au niveau des substrats ultramafiques à une altitude comprise entre 10 et 1000 mètres.

Distribution géographique

Cette espèce est commune sur l'ensemble de la « Grande Terre » (sauf dans l'extrême Nord et le Nord - est) et aussi à l'Ile des Pins. Toutefois, elle semble inféodée au substrat ultramafique.



Distribution géographique de *Stenocarpus milneii*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Particularités biologiques

Cette espèce est très reconnaissable à son feuillage très découpé. C'est parfois un arbuste de toute beauté avec un feuillage vert foncé et de très grandes fleurs d'un rouge rosé, écotype que l'on peut observer au Boulinda et au Paéoua, par exemple.

Technique et conseil de récolte

La difficulté réside dans le fait que la maturité des fruits est très variable entre les peuplements voire au sein du même peuplement.
Les fruits secs déhiscents doivent être collectés juste avant leur ouverture.

Extraction et conditionnement des graines

Les infrutescences sont mises à sécher au sec sous des néons ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 1,47 (± 0,08) g,
soit environ 68 (± 6) graines/g.

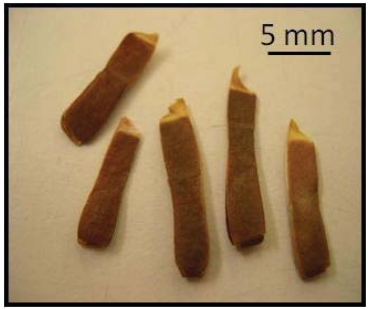
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid sec

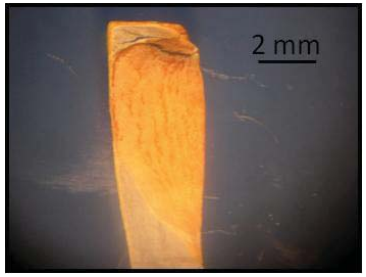
Description de la semence

1/ Structure externe :

La semence présente une forme grossièrement rectangulaire, sa taille varie de 3-4 x 10-17 mm. La graine présente une partie ailée importante, plate de couleur marron clair (3-4 x 10-17 mm) et une partie située à l'autre extrémité de la semence, de forme rectangulaire bombée, de couleur jaunâtre (3-4 x 6-8 mm). La partie ailée recouvrant la graine permet probablement une dissémination par le vent.



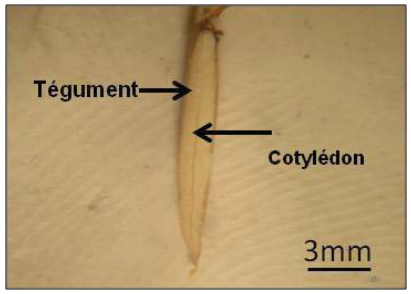
Graines fertiles de *Stenocarpus milneii* (©LIVE/UNC)



Graine de *Stenocarpus milneii* en gros plan (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

Les coupes transversales et longitudinales révèlent la présence d'un tégument très fin entourant un embryon qui occupe la totalité de l'espace, il n'y a pas d'albumen et il s'agit donc d'une graine exalbuminée.



Coupe longitudinale d'une graine de *Stenocarpus milneii* (©LIVE/UNC)

Analyse des réserves séminales

- *Composition brute en protéines*

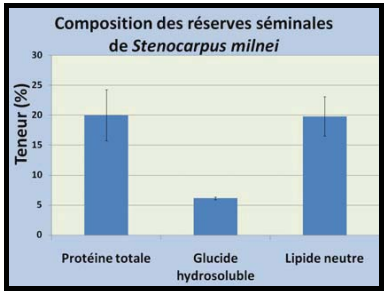
17,68 ± 3,76 mg/100mg de matière fraîche
20,00 ± 4,25 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

5,45 ± 0,19 mg/100mg de matière fraîche
6,16 ± 0,22 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

17,52 ± 2,90 mg/100mg de matière fraîche
19,81 ± 3,28 mg/100mg de matière sèche



L'analyse des réserves séminales montre une répartition quasi similaire de la fraction protéinique et de la fraction lipidique neutre. La fraction glucide hydrosoluble ne représentant que 6,16% des réserves totales.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine :

- Graine:
  8,21 % (± 0.06).

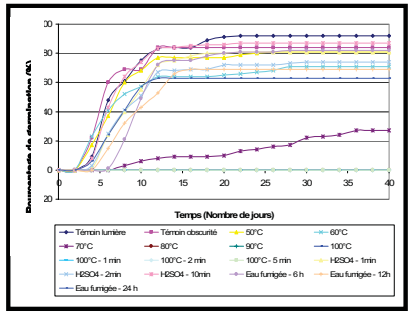
Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.

Viabilité du lot de semence

D'après le test au chlorure de tétrazolium, la viabilité est de 63 ± 2 %.

Germination

Une étude de l'influence de différents traitements sur la germination des graines de cette espèce a été réalisée. Elle révèle qu'aucun traitement n'est nécessaire pour obtenir le meilleur taux de germination soit 92% à une température de 25°C, avec un temps de latence de 4 jours.



Stenocarpus umbelliferus

Famille

Proteaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie 43 espèces **toutes endémiques** réparties en 9 genres dont 6 endémiques et 3 autochtones.
Le genre *Stenocarpus* compte 12 espèces **toutes endémiques** à la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbuste tortueux ou élancé ou arbrisseau pouvant atteindre 5 m de haut. Il possède une écorce brunâtre fendillée.

- Description des feuilles

Feuilles entières, épaisses, coriaces, raides et dressées. Les nervures sont au nombre de 4 ou 5, elles sont peu visibles. La dimension du limbe est de 15 à 110 mm de longueur pour 2 à 40 mm de largeur. Le pétiole mesure de 3 à 12 mm.

Individu adulte de *Stenocarpus umbelliferus* (©R. Amice)

- Description de la fleur

Les fleurs se présentent sur des inflorescences isolées terminales en ombelle. On peut compter 3 à 8 fleurs par ombelle. Elles sont de couleurs blanchâtres à jaune pale. Le pédicelle est de couleur rougeâtre ou glauque. Les bourgeons sont glabres ou légèrement velus.

Fleur de *Stenocarpus umbelliferus* (©T. Waters)

- Description du fruit

Fruits en follicules portés par un carpophore robuste s'ouvrant par une fente longitudinale. Les follicules ont une taille allant de 25 à 80 mm de longueur pour 3 à 5 mm de largeur. Les fruits sont glabres et noirâtre à maturité. Les graines sont nombreuses.

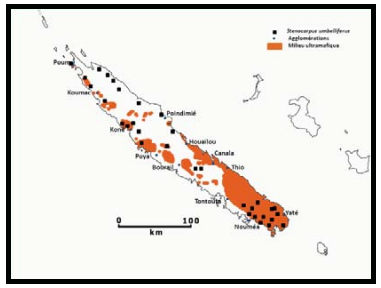
Fruit de *Stenocarpus umbelliferus* (©I. & D. Létocart)

Habitat

Elle se développe aussi bien en maquis miniers, formations paraforestières ou forêts humides. Elle s'installe préférentiellement sur des terrains ferralitiques ou sur des substrats ultramafiques et siliceux ou sur substrat sédimentaire bien alimentés en eau.

Distribution géographique

Largement répandue au sud de la « Grande Terre », mais totalement absente des Loyautés. Elle se situe préférentiellement à basse altitude mais on peut la rencontrer jusqu'à 1300 m.



Distribution géographique de *Stenocarpus umbelliferus*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- La floraison et la fructification s'étalent tout au long de l'année.

Période et stade de récolte des fruits et/ou graines

- Tout au long de l'année
- Récolte des fruits lorsque les gousses sont bien formées ouvertes ou fermées

Technique et conseil de récolte

- Manuellement

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 1,25 (± 0,1) g,
soit 80 (± 6) graines/g.

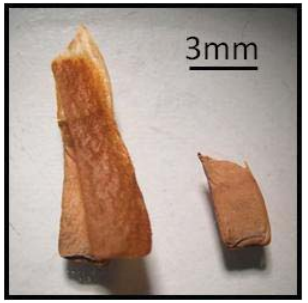
Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

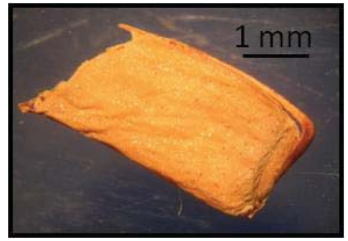
Description de la semence

1/ Structure externe :

La taille des semences est de 1,4-1,6 x 0,3-0,4 cm avec la partie ailée et 0,7-0,8 x 0,3-0,4 cm sans la partie ailée. Cette graine est rectangulaire et aplatie, avec une extrémité plus rectiligne que l'autre.
Elle présente une partie ailée de couleur marron facilement retirée à la main.



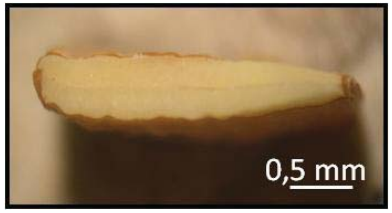
Graine de *Stenocarpus umbelliferus* avec partie ailée (à gauche) et sans (à droite) (©LIVE/UNC)



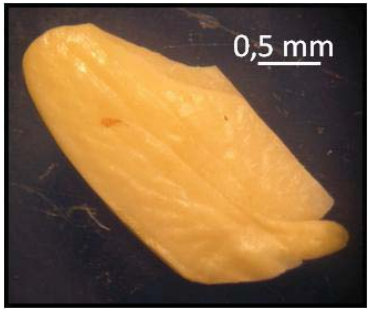
Graine de *Stenocarpus umbelliferus* sans la partie ailée (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

Graine de type exalbuminé. On n'observe pas d'albumen mais seulement l'embryon qui occupe tout l'espace.



Coupe transversale de la graine de *Stenocarpus umbelliferus* (©LIVE/UNC)



L'embryon de la graine de *Stenocarpus umbelliferus* (©LIVE/UNC)

La dissection ne met pas en évidence de couche tégumentaire épaisse, cette dernière n'a surement pas d'inhibition mécanique.

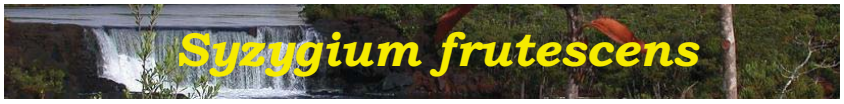
L'embryon est blanchâtre, il occupe la totalité de l'espace. La radicule est dirigée vers la base de la graine.

Degré d'humidité des graines

Taux d'hydratation de la graine apte à germer:

- Graine entière :
  7,83 % (+/- 0.20).

Il s'agit donc d'une graine de type orthodoxe.



Famille

Myrtaceae

Généralités sur la famille

La famille compte plus de 120 genres et près de 4000 espèces dans le monde.
La famille comporte 235 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 231 sont endémiques, réparties sur 21 genres dont 6 endémiques. Il s'agit de la famille la plus importante en Nouvelle-Calédonie. Le genre *Syzygium* compte en Nouvelle-Calédonie 68 espèces, dont 67 sont endémiques.

Description de l'individu adulte

- Arbuste ou arbre pouvant atteindre 30 m.

Allure générale de *Syzigium frutescens* (©D. & I. Létocart)

- Description des feuilles

Feuilles pétiolées, obovées ou elliptiques, un peu coriaces. Elles sont acuminées ou arrondies au sommet, et atténuées ou arrondies à la base. Elle peut mesurer de 2,5 à 9 cm de longueur pour 1,5 cm à 4 cm de largeur. Elles possèdent des nervures secondaires fines et denses. On peut voir les glandes oléagineuses au dessous.

- Description de la fleur

Fleurs possédant un hypanthium court campanulé, des fruits globuleux. Elles sont de couleurs blanches, sessiles, souvent groupées par 2 ou 3 sur des inflorescences terminales ou axillaires en corymbes ramifiées. Elles possèdent 4 sépales et 4 pétales libres et caduques.

Inflorescence de *Syzigium frutescens*
(herbier de l'IRD (NOU))

- Description du fruit

Il s'agit de drupes globuleuses roses ou rouges à maturité. Fruits entièrement charnus. Un fruit possède une à deux graines.

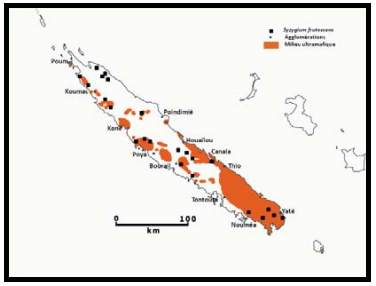
Fruits de *Syzigium frutescens*
(©JL. Ruiz)

Habitat

Elle se développe aussi bien en forêts denses humides, dans les formations paraforestières, qu'en maquis miniers. Elle s'installe préférentiellement sur des substrats ultramafiques et sédimentaires et sur sol gravillonnaire issu de la cuirasse ferrallitique démantelée.

Distribution géographique

Largement répandue sur la « Grande Terre », depuis 150 mètres et jusqu'à 1250 mètres d'altitude. Espèce absente des iles loyautés.



Distribution géographique de *Syzygium frutescens*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU) en 2009.

Phénologie

- Floraison de septembre à mars
- Fructification principalement de novembre à août.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 4,83 (± 0,1) g, soit 20 (± 2) graines/g.

Description de la semence

1/ Structure externe :

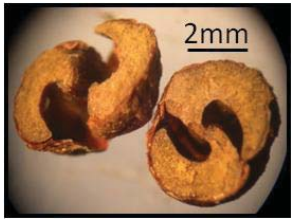
La taille des semences est de 0,4-0,5 x 0,3-0,4 cm pour 3 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme ronde dans l'ensemble, mais n'est pas régulière. Elle présente une couleur violette foncée avec des taches jeunes (moisissures). Elle a un aspect rugueux.

Face ventrale d'une graine de *Syzygium frutescens* (©LIVE/UNC)

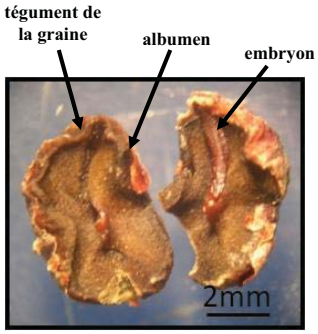
Face dorsale d'une graine de *Syzygium frutescens* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine de type albuminé



Coupe transversale d'une graine de *Syzygium frutescens* (©LIVE/UNC)



Coupe longitudinale d'une graine de *Syzygium frutescens* (©LIVE/UNC)

Embryon d'une graine de *Syzygium frutescens* (©LIVE/UNC)

La dissection met en évidence une couche tégumentaire peu épaisse.
L'albumen de couleur marron occupe les ¾ de la place. L'embryon est rougeâtre.
L'embryon est axile, c'est-à-dire que celui-ci est placé dans l'axe de la graine.

Tapeinosperma sp.

Famille

Myrsinaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie, 55 espèces dont 54 endémiques. Il y a 3 genres autochtones.
Le genre *Tapeinosperma* compte 39 espèces **toutes endémiques**.

Description de l'individu adulte

Il s'agit généralement d'un arbuste pouvant atteindre 4 m de hauteur.

Habitat

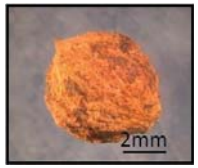
On retrouve ce genre principalement dans les forêts denses humides, mais on peut le retrouver sur maquis minier.

Données quantitatives

Poids de 100 graines: 10,44 (± 0,58) g,
soit environ 9 (± 1) graines/g.

Description de la semence

1/ Structure externe :
Graine de 6 à 7 mm de longueur, 4 à 6 mm de largeur et 5 à 6 mm d'épaisseur. De forme ronde à ovale. Elle présente une couleur marron clair à marron foncé. Elle est striée longitudinalement avec un aspect rugueux. Son tégument est dur. Elle a une extrémité aplatie et l'autre pointue.

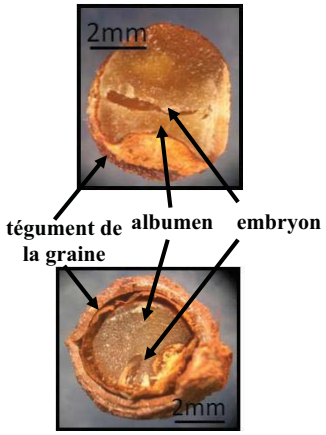


Graine de *Tapeinosperma sp.* (©LIVE/UNC)

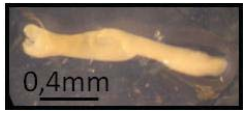
Plusieurs graines de *Tapeinosperma sp.* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La graine a un tégument externe marron épais et dur. Un tissu nourricier de couleur marron qui occupe les ¾ de la semence et qui entoure un embryon blanc, visible à l'œil nu.
La graine semble donc être de type albuminé.



Coupe transversale (en haut) et longitudinale (en bas) d'une graine de *Tapeinosperma sp.* (©LIVE/UNC)



Embryon issu d'une graine de *Tapeinosperma sp.* (©LIVE/UNC)

Tristianopsis guillainii var. guillainii

Famille

Myrtaceae

Généralités sur la famille

La famille compte en Nouvelle-Calédonie, 237 espèces, dont **233 sont endémiques**. Cette famille est composée d'arbres, arbustes, arbrisseaux ou lianes.

C'est la famille la plus importante de Nouvelle-Calédonie. Elle compte des genres à très large distribution: *Eugenia* et *Syzygium*, mais également des genres endémiques: *Arillastrum*, *Carpolepis*, *Cloezia*, *Pleurocalyptus* et *Purpureostemon* (de la sous-famille des Leptospermoidées, possédant des fruits secs, centrée sur l'Australie) et *Cupheanthus* et *Myrtastrum* (de la sous-famille des Myrtoidées possédant des fruits charnus, à large distribution tropicale), des genres subendémiques : *Archirhodomyrtus, Piliocalyx, Uromyrtus* ; des genres australiens : *Babingtonia, Callistemon, Melaleuca* ; ainsi que des genres australo-papous : *Austromyrtus, Rhodomyrtus, Xanthostemon*. Les 7 genres restant ont des distributions principalement pacifique, indo-malésienne, indo-australienne.

Cette famille est parfaitement adaptée aux sols pauvres. Elle présente une gamme importante d'espèces susceptibles d'être utilisées pour la revégétalisation. Mais compte tenu de leur faible pouvoir enrichissant du sol et du risque de toxicité vis-à-vis des autres espèces, elles ne devront être utilisées qu'en mélange avec des espèces d'autres familles (Jaffré & Rigault, 1991).

Le genre *Carpolepis* endémique à la Nouvelle-Calédonie est composé de 3 espèces.

Quant au genre *Tristianopsis,* endémique lui aussi, il est composé de 13 espèces.

Description de l'individu adulte

- Arbrisseau ou arbre atteignant jusqu'à 15 m de hauteur. Possédant un système racinaire très développé. Cette espèce résiste bien à l'aridité.

Pied adulte *in situ* de *Tristianopsis guillainii* var. *guillainii* (©R. Amyce)

- Description des feuilles

Feuilles à pétiole de 5-20 mm de long et 1,5-2,5 mm de large. Limbe coriace de 4-12 mm de long et 1,5 mm de large.

- Description des fleurs

Fleurs abondantes, pétales jaunes ou orange et longues étamines, 15 à 30, groupées en faisceaux dans la fleur.

Inflorescence de *Tristianopsis guillainii* var. *guillainii* (©D. & I. Létocart)

- Description du fruit

Fruits de *Tristianopsis guillainii* var. *guillainii* (©T. Jaffre et B. Pelletier)

Fruits mûrs d'octobre à juillet.

Habitat

L'espèce se développe sur maquis minier et affectionne surtout les sols ferralitiques caillouteux ou gravillonnaires plus ou moins acides sur substrat ultramafique.

Distribution géographique

Largement répandue depuis 10 mètres jusqu'à 1200 mètres, le plus souvent en peuplements denses.

Cette variété est positionnée au nord d'une ligne Boulouparis – Canala mais elle peut être présente, bien que très rarement, dans le sud. La deuxième variété de *Tristaniopsis guillainii* étant positionnée dans le grand massif du sud.

Distribution géographique de *Tristianopsis guillainii* var. *guillainii*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Technique et conseil de récolte

Floraison de mars à décembre avec un maximum en juin et juillet. Les fruits sont matures entre octobre et juillet.

Les fruits doivent être récoltés en bouquets lorsque qu'ils sont matures, c'est-à-dire lorsque la fente de déhiscence apparaît.

Extraction et conditionnement des graines

Les fruits secs déhiscents sont mis à sécher au sec à la lumière ou au soleil. Les semences matures sont alors libérées et il est aisé de les récupérer par tamisage.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 0,24 (± 0,01) mg,
soit environ 420 (± 20) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)
- A température ambiante le taux de germination chute plus rapidement.

Description de la semence

1/ Structure externe :

Graine membraneuse ailée de forme allongée, 2,2 mm x 0,2 mm, de couleur jaune à marron clair avec un embryon visible.

La distinction entre les graines fertiles et infertiles se fait par la présence d'une zone bombée correspondant à l'embryon.

Graines fertiles de *Tristianopsis guillainii* var. *guillainii* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

La dissection de la graine révèle la présence de deux tissus : le tégument et l'embryon qu'il renferme.

Il s'agit donc d'une graine de type exalbuminé.

La structure fine du tégument permet une accessibilité aisée à l'eau.

Analyse des réserves séminales

Cette analyse a été réalisée sur le lot référencé M8 :

- *Composition brute en protéines*

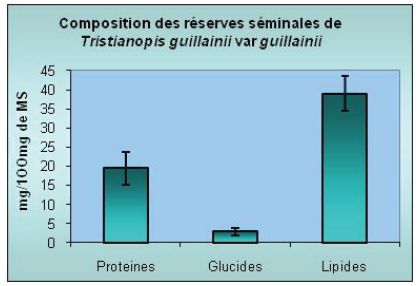
17,77 ± 3,92 mg/100mg de matière fraîche
19,48 ± 4,30 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en glucides*

2,60 ± 0,95 mg/100mg de matière fraîche
2,85 ± 1,04 mg/100mg de matière sèche

- *Composition brute en lipides*

35,60 ± 4,24 mg/100mg de matière fraîche
39,02 ± 4,65 mg/100mg de matière sèche



Cette espèce a par ailleurs fait l'objet d'une analyse fine des constituants lipidiques par la recherche des acides gras constitutifs des lipides totaux :

Carbon number	Systematic name	Common name	% fatty acid in total fatty acids
C 16:0	Hexadecanoic	Palmitic	6,25
C 18:0	Octadecanoic	Stearic	7,62
C 18:1Δ9	cis-9-Octadecanoic	Oleic	20,29
C 18:2Δ9,12	cis,cis-9,12-Octadecadienoic	Linoleic	59,42
C 18:3Δ9,12,15	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic	α-Linolenic	0,18
C 20:0	Eicosanoic	Arachidic	0,58
C 20:1Δ11	cis-11-Eicosanoic	Eicosenoic	2,90
Total of identified Fatty acids in seeds (mg/g)			97,24

Il est à noter qu'une faible quantité d'acides gras présents en trace n'a pu être identifiée. Ils sont en cours d'étude.

Degré d'humidité

- Graine en poudre:
  8,77 % (± 0,28).

Il s'agit donc d'une semence orthodoxe.

Famille

Myrtaceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 235 espèces en Nouvelle-Calédonie, dont 231 sont endémiques, réparties sur 21 genres. Le genre *Xanthostemon* compte 19 espèces **toutes endémiques** de la Nouvelle-Calédonie.

Description de l'individu adulte

- Arbuste pouvant atteindre 3 à 4 m.

Allure générale de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

Feuilles de 6 à 15 cm de long et 3 à 7 cm de large. Feuilles sessiles, coriaces, elliptiques, gaufrées, velues, arrondies au sommet, arrondies ou cordées à la base; marge révolutée; nervures secondaires bien visibles. Jeunes feuilles de couleur rougeâtres.

Feuilles de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

Jeunes feuilles de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

Les fleurs sont pentamères, et groupées de 2 à 10 sur des inflorescences axillaires. Les étamines sont nombreuses de 3 à 50, de couleur jaune fauve et disposées à l'aisselle des feuilles terminales.

Boutons floraux de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

Fleurs épanouies de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Capsules arrondies, plus larges que hautes, glabres, avec 3-5 loges.

Fruit de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

Habitat

Elle se développe essentiellement en maquis sur pente ou rivulaire. Elle s'installe préférentiellement sur sol plus ou moins érodé ou rocheux sur substrat ultramafique.

Distribution géographique

Espèce présente sur la côte ouest de la « Grande Terre » dans la région de Poya (Nékoro, Népoui, Boulinda, Kopéto) et Pouembout (Tiéa) depuis 10 mètres et jusqu'à 500 mètres.

Distribution géographique de *Xanthostemon ferrugineus*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Phénologie

- Floraison à partir d'Août.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 0,218 (± 0,008) g, soit 459 (± 17) graines/g.

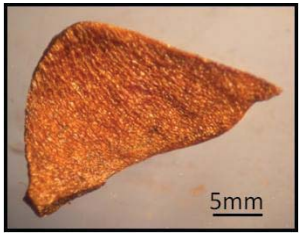
Techniques de conservation

- A température ambiante et sec pendant plusieurs mois
- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

Description de la semence

1/ Structure externe :

La taille des semences est de 0,3-0,4 x 0,2-0,3 cm. Cette graine présente une forme triangulaire (de boomerang), avec une base plate et un sommet arrondi.
Elle est de couleur marron clair et plate.



Graine de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

3/ Structure interne

Graine sèche à l'intérieur, pourtant le lot est frais. Nous n'avons pas pu déterminer si elle est de type albuminé ou exalbuminé.

Coupe d'une graine de *Xanthostemon ferrugineus* (©LIVE/UNC)

Zygogynum pancheri ssp. pancheri

Famille

Winteraceae

Généralités sur la famille

La famille comporte 19 espèces en Nouvelle-Calédonie, **toutes endémiques**, réparties sur 1 seul genre. Le genre *Zygogynum*.

Description de l'individu adulte

- Arbuste ou petit arbre pouvant atteindre 10 m; rameaux grêles ou robustes.

Allure générale de *Zygogynum pancheri ssp. pancheri* (©LIVE/UNC)

- Description des feuilles

Feuilles avec un pétiole de 1 à 3,5 cm, espacées mais localisées seulement à l'extrémité des axes. Elles sont grandes, elliptiques, arrondies au sommet, aiguës à la base, un peu coriaces; nervures un peu saillantes.

Feuilles de *Zygogynum pancheri ssp. pancheri* (©LIVE/UNC)

- Description de la fleur

Fleurs jaunes solitaires ou plus de 30 groupées sur 3 - 13 inflorescences partielles.

Vue d'une inflorescence de *Zygogynum pancheri ssp. pancheri* (©LIVE/UNC)

- Description du fruit

Fruits obovoïdes ou globuleux de 13 mm, noirs à maturité; graines 2-16, aplaties à surface pustuleuse, noires à maturité.

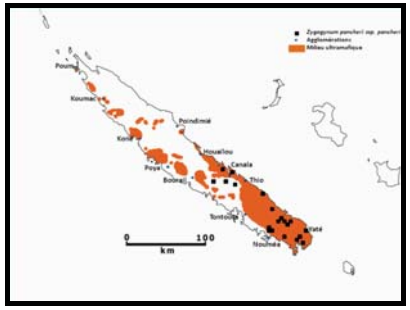
Fruits matures (à gauche) et verts (à droite) de *Zygogynum pancheri ssp. pancheri* (©LIVE/UNC)

Habitat

Elle se développe en sous-bois de la forêt dense humide. Elle s'installe préférentiellement sur sol plus ou moins profond sur substrat ultramafique et sédimentaire.

Distribution géographique

On retrouve cette espèce dans le sud et le centre de la « Grande Terre ».



Distribution géographique de *Zygogynum pancheri ssp. pancheri*, figure réalisée d'après l'herbier de l'IRD (NOU).

Phénologie

- Floraison principalement de juillet à octobre.
- Fructification principalement de novembre à mars.

Données quantitatives

Poids de 100 graines : 1,12 (± 0,04) g,
soit 89 (± 3) graines/g.

Techniques de conservation

- Conservation préférable au froid (4°C au froid sec)

Description de la semence

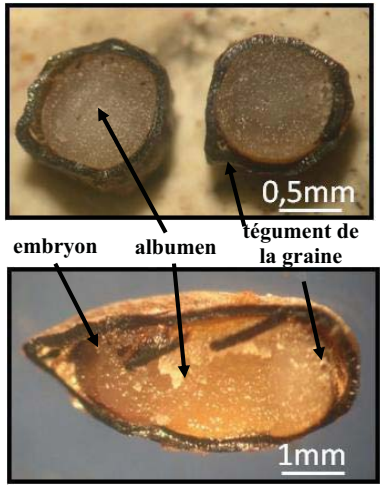
1/ Structure externe :

La taille des semences est de 0,4-0,5 x 0,1-0,2 cm pour 0,5 mm d'épaisseur. Cette graine présente une forme de goutte d'eau avec une extrémité pointue et une extrémité plus arrondie. Elle est plate sur un coté dans la longueur. Elle est de couleur marron, avec un aspect luisant.

Graine de *Zygogynum pancheri ssp. pancheri* (©LIVE/UNC)

2/ Structure interne

Graine de type albuminé (observation d'un embryon de petite taille à une extrémité de la graine).



Coupe transversale (en haut) et longitudinale (en bas) de *Zygogynum pancheri ssp. pancheri* (©LIVE/UNC)

L'albumen occupe une grande partie de l'espace et est de couleur blanchâtre.

ANNEXE 2

Tableau S2 : Ensemble des protéines de la fraction albumine de la graine entière de *Psychotria douarrei* réparties selon leur classe fonctionnelle.

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Cell growth et Cell structure									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-159895414	actin	Cell structure-Cytoskeleton	19a	*Ziziphus jujuba*	17548	4,65	14	59	1
gi-116057804-emb-CAL54007.1-	myosin (class II heavy chai	Cell structure-Cytoskeleton	929	*Ostreococcus tauri*	466900	6,17	0	50	1
gi-460761-emb-CAA50750.1-	fibrillin	Cell structure-Chloroplast	2749	*Capsicum annuum*	35238	5,08	4	81	1
gi-223529961-gb-EEF31888.1-	proliferation-associated 2g4 (EBP1)	Cell growth/division-Cell cycle	2773	*Ricinus communis*	43344	6,31	17	267	5
gi-217073888-gb-ACJ85304.1-	proliferation-associated 2g4 (EBP1)	Cell growth/division-Cell cycle	2777	*Medicago truncatula*	43483	5,9	7	48	1
gi-226493041	actin	Cell structure-Cytoskeleton	2916b	*Zea mays*	41653	5,3	26	448	8
gi-116060488	kinesin	Cell structure-Cytoskeleton	2995	*Ostreococcus tauri*	88252	5,54	1	101	2
gi-22857914	actin	Cell structure-Cytoskeleton	3070	*Nicotiana tabacum*	15793	5,29	8	78	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Disease/Defence-Detoxification									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (<40)	Nb peptides
gi-58578272	glutathione S-transferase	Disease/Defence-Detoxification	30	*Capsicum chinense*	25537	5,79	10	186	4
gi-58578272	glutathione S-transferase	Disease/Defence-Detoxification	31	*Capsicum chinense*	25537	5,79	10	184	4
gi-3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	33	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	7	86	2
gi-2853219	glutathione S-transferase	Disease/Defence-Detoxification	34	*Carica papaya*	25358	5,78	11	198	4
gi|3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	36	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	26 259,00		99,80%	7,92%	2
gi|118485163,gi|224065178,gi|255641537,gi|283135904,gi|667326 27,gi|58131811	dehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	39	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	30 009,60		99,90%	7,41%	2
gi|225444485,gi|270234633	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	42	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	33 097,80		100,00%	9,59%	2
gi|224143607	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	43	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	31645,40		99,80%	3,90%	1
gi-217072032-gb-ACJ84376.1-	aldo/keto reductase	Disease/Defence-Detoxification	855	*Medicago truncatula*	26363	5,22	13	124	2
gi-6006619-emb-CAB56851.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	929	*Prunus persica*	25439	8,62	17	68	1
gi-222833311-gb-EEE71788.1-	oxalate oxidase	Disease/Defence-Detoxification	997	*Populus trichocarpa*	21530	5,5	4	65	1
gi-119367465-gb-ABL67649.1-	thioredoxin-dependent peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	1345	*Citrus cv. Shiranuhi*	17329	5,15	21	106	2
gi-3719457-gb-AAC63379.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	2620	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	17	44	2
gi-157328520-emb-CAO21229.1-	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	2625	*Vitis vinifera*	33094	5,5	25	236	4
gi-50058092-dbj-BAD27392.1-	dehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2626	*Zinnia elegans*	24042	5,47	10	69	1
gi|3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	2626	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	11	75	2
gi-1755160	germin-like protein	Disease/Defence-Detoxification	2629	*Arabidopsis thaliana*	21779	5,81	11	62	1
gi-6006619-emb-CAB56851.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	2633	*Prunus persica*	25439	8,62	17	68	1
gi-66732627	dehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2662	*Lotus japonicus*	29082	7,75	3	85	2
gi-225444485	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	2669	*Vitis vinifera*	33094	5,5	23	432	6
gi-194716776-gb-ACF93237.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2747	*Picrorhiza kurrooa*	52700	6,87	4	103	2
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2748	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	9	169	3
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2792	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	14	172	3
gi-194690106-gb-ACF79137.1-	oxalyl-CoA decarboxylase	Disease/Defence-Detoxification	2800	*Zea mays*	60219	6,05	3	62	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Disease/Defence-Detoxification									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-15320419-dbj-BAB63925.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2810	*Spinacia oleracea*	53978	6,65	4	105	2
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2821	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	12	222	3
gi-117067068	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2821	*Acanthus ebracteatus*	46552	5,33	11	238	4
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2839	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	8	125	2
gi-225440936	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2840	*Vitis vinifera*	47293	6,32	11	343	6
gi-15865451	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2840	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	11	153	3
gi-14031049	peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	2903	*Nicotiana tabacum*	39039	5,99	9	306	4
gi-1389835	peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	2903	*Linum usitatissimum*	38171	8,07	7	194	3
gi-146432261	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2905	*Vitis vinifera*	47250	5,93	3	97	1
gi-146432261	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2914	*Vitis vinifera*	47250	5,93	5	95	1
gi-146432261	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2917	*Vitis vinifera*	47250	5,93	4	105	1
gi-2213425	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3025	*Citrus x paradisi*	32623	5,46	27	555	8
gi-147783624	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3025	*Vitis vinifera*	37361	5,86	3	82	1
gi-147778328	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3026	*Vitis vinifera*	41644	5,3	9	145	3
gi-2213425	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3026	*Citrus x paradisi*	32623	5,46	8	121	2
gi-3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	3035	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	12	170	3
gi-224143607	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3046	*Populus trichocarpa*	31642	5,26	17	269	5
gi-38228697-emb-CAE54085.1-	superoxide dismutase	Disease/Defence-Detoxification	3077	*Fagus sylvatica*	16714	6,27	6	118	2
gi-220898263	superoxide dismutase (Cu-Zn)	Disease/Defence-Detoxification	3078	*Ginkgo biloba*	21830	6,75	18	304	5
gi-586004	superoxide dismutase	Disease/Defence-Detoxification	3080	*Ipomoea batatas*	15072	5,64	13	93	2
gi-12744890	superoxide dismutase (Cu-Zn)	Disease/Defence-Detoxification	3080	*Avicennia marina*	15272	5,77	8	55	1
gi-119367465	thioredoxin-dependent peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	3082	*Citrus hybrid cultivar*	17329	5,15	11	152	3
gi-14031049-gb-AAK52084.1-	peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	3156	*Nicotiana tabacum*	39039	5,99	7	185	3

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Disease/Defence-Stress response									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	6a	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	5	73	1
gi-169159968	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	6b	*Lindernia brevidens*	25044	5,5	8	88	1
gi-124361117	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	7	*Medicago truncatula*	32121	6,13	7	66	1
gi-225432033	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	14	*Vitis vinifera*	43283	9,36	4	84	1
gi-224088144	universal stress protein	Disease/Defence-Stress responses	32	*Populus trichocarpa*	18597	6,51	6	61	1
gi|225432033,gi|270234247	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	40	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	43 293,30		99,80%	4,24%	1
gi|225432033,gi|270234247	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	41	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	43 293,30		95,00%	4,24%	1
gi|225432033,gi|270234247	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	42	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	43 293,30		99,80%	4,49%	2
gi|30844168	chitinase	Disease/Defence-Stress responses	44	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	35 463,70		94,70%	6,88%	1
gi|255556348	LEA protein (seed maturation protein PM36)	Disease/Defence-Stress responses	46	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	26 434,10		98,20%	4,35%	1
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	700	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	4	166	2
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	712	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	5	76	1
gi-222854318-gb-EEE91865.1-	universal stress protein	Disease/Defence-Stress responses	826	*Populus trichocarpa*	18597	6,51	6	76	1
gi-12323093-gb-AAG51530.1-AC051631_10	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	982	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	2	61	1
gi-7362753-emb-CAB83123.1-	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	982	*Arabidopsis thaliana*	34709	5,27	5	77	1
gi-224088144	universal stress protein	Disease/Defence-Stress responses	1133	*Populus trichocarpa*	18597	6,51	6	64	1
gi-18839-emb-CAA39880.1-	stress-related protein	Disease/Defence-Stress responses	2564	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	36	145	2

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Disease/Defence-Stress response									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-18839-emb-CAA39880.1-	stress-related protein	Disease/Defence-Stress responses	2573	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	27	186	3
gi-12323093-gb-AAG51530.1-AC051631_10	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	2632	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	2	61	1
gi-7594536-emb-CAB88061.1-	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	Disease/Defence-Stress responses	2660	*Arabidopsis thaliana*	68109	5,76	2	50	1
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	2678	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	5	52	1
gi-20135572-gb-AAM08913.1-	betaine aldehyde dehydrogenase	Disease/Defence-Stress responses	2709	*Atriplex prostrata*	54699	5,37	8	145	3
gi-16796239 2-dbj-BAG09376.1-	betaine aldehyde dehydrogenase	Disease/Defence-Stress responses	2710	*Glycine max*	54576	5,35	15	115	2
gi-20135572	betaine aldehyde dehydrogenase	Disease/Defence-Stress responses	2712	*Atriplex prostrata*	54699	5,37	8	258	4
gi-63145794	betaine aldehyde dehydrogenase	Disease/Defence-Stress responses	2712	*Chrysanthemum lavandulifolium*	54899	5,53	5	134	2
gi-115353973	betaine aldehyde dehydrogenase	Disease/Defence-Stress responses	2712	*Kalidium foliatum*	54484	5,26	-34	97	2
gi-63145794-gb-AAY33872.1-	betaine aldehyde dehydrogenase	Disease/Defence-Stress responses	2773	*Chrysanthemum lavandulifolium*	54899	5,53	6	216	3
gi-14495190-dbj-BAB60909.1-	universal stress protein	Disease/Defence-Stress responses	2907	*Oryza sativa Japonica Group*	17910	7	4	67	1
gi-12323093-gb-AAG51530.1-AC051631_10	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3016	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	12	65	1
gi-12323093-gb-AAG51530.1-AC051631_10	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3017	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	7	135	2
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3020	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	7	113	2
gi-15203204 2	betaine aldehyde dehydrogenase	Disease/Defence-Stress responses	3020	*Eupatorium lindleyanum*	13423	4,78	7	54	1
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3037	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	5	80	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Disease/Defence-Stress response									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3037	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	5	80	1
gi-118926-sp-P22242.1-DRPE_CRAPL	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3044	*Craterostigma plantagineum*	33731	5,76	11	150	2
gi-12323093-gb-AAG51530.1-AC051631_10	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3044	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	7	163	2
gi-12323093-gb-AAG51530.1-AC051631_10	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3045	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	7	170	2
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3048	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	5	85	1
gi-12323093	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3061	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	5	73	1
gi-14423842	stress and pathogenesis-related protein	Disease/Defence-Stress responses	3071	*Prunus armeniaca*	17341	4,87	5	68	2
gi-7362753-emb-CAB83123.1-	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3076	*Arabidopsis thaliana*	34709	5,27	5	77	1
gi-124361117	desiccation-related protein (PCC13-62 like)	Disease/Defence-Stress responses	3128	*Medicago truncatula*	32121	6,13	6	77	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-Fermentation									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-16267	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	5	*Arabidopsis thaliana*	38190	7,59	2	81	1
gi-118488941	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	14	*Populus trichocarpa x Populus deltoides*	40586	8,49	6	139	2
gi-113363	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	21	*Petunia x hybrida*	41547	6,19	9	251	5
gi-192912998-gb-ACF06607.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	364		41015	6,03	5	123	2
gi-157358403-emb-CAO66063.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	446	*Vitis vinifera*	32674	5,72	6	71	2
gi-223525426-gb-EEF28018.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2596	*Ricinus communis*	39043	7,56	4	30	1
gi-157358403-emb-CAO66063.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2657	*Vitis vinifera*	32674	5,72	6	71	2
gi-192912998-gb-ACF06607.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2678	*Elaeis guineensis*	41015	6,03	5	123	2
gi-20506-emb-CAA38039.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2679	*Petunia x hybrida*	41547	6,19	9	178	3
gi-157358403-emb-CAO66063.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2681	*Vitis vinifera*	32674	5,72	6	71	2
gi-913941-gb-AAB33843.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2805	*Brassica napus*	52654	5,52	2	78	1
gi-11995457-gb-AAG43027.1-AF323586_1	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2806	*Oryza sativa*	54467	6,67	6	186	3
gi-223526488-gb-EEF28759.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2840	*Ricinus communis*	40718	6,37	17	256	5
gi-1675394-gb-AAB19117.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2844	*oryza sativa*	40802	6,78	7	131	3
gi-113363	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2956	*Petunia x hybrida*	41547	6,19	17	309	6
gi-13958681	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2967a	*Paeonia peregrina*	22881	6,25	10	242	2
gi-68138959	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2970	*Citrus x paradisi*	41313	5,82	7	137	3
gi-147783624-emb-CAN68145.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	2971	*Vitis vinifera*	37361	5,86	7	106	1
gi-222852628-gb-EEE90175.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	3119	*Populus trichocarpa*	38168	7,59	6	124	2
gi-113363	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	3148	*Petunia x hybrida*	41547	6,19	16	386	7
gi-20506-emb-CAA38039.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	3149	*Petunia x hybrida*	41547	6,19	9	178	3
gi-20506-emb-CAA38039.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	3149	*Petunia x hybrida*	41547	6,19	9	178	3

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-glycolysis & Gluconegenesis									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-120668	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	9	*Hordeum vulgare*	33215	6,2	6	86	1
gi-34099812	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	15	*Panax ginseng*	31792	6,4	18	232	4
gi|255550894	phosphofructokinase	Energy-Glycolysis	38	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	53086,00		99,20%	2,68%	1
gi|255635100	triosephosphate isomerase	Energy-Glycolysis	46	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	33106,00		99,50%	4,21%	1
gi|225434935	triosephosphate isomerase	Energy-Glycolysis	46	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	27329,90		99,90%	10,20%	2
gi|225434935	triosephosphate isomerase	Energy-Glycolysis	47	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	27329,90		99,80%	10,20%	2
gi|255635100	triosephosphate isomerase	Energy-Glycolysis	47	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	33106,00		99,00%	4,53%	1
gi-3021338-emb-CAA06308.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase (cytosolic)	Energy-Glycolysis	380	*Cicer arietinum*	38428	6,21	3	102	2
gi-7529717-emb-CAB86897.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	380	*Arabidopsis thaliana*	38516	6,05	6	238	4
gi-18978-emb-CAA42901.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	415	*Hordeum vulgare*	36491	6,67	6	147	2
gi-149207273	fructose-1,6-bisphosphatase (cytosolic)	Energy-Glycolysis	415	*Flaveria linearis*	36245	6,95	19	317	5
gi-34099812	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	415	*Panax ginseng*	31792	6,4	14	206	3
gi-34099812	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	424	*Panax ginseng*	31792	6,4	23	469	7
gi-255644696	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	424	*Glycine max*	42518	8,73	20	350	7
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	446	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	95	1
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	483	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	86	1
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	588	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	82	1
gi-242062224	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	588	*Sorghum bicolor*	36323	6,61	14	304	5
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	825	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	88	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-glycolysis & Gluconegenesis									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	1150	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	87	1
gi-62631846	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2295	*Pternandra caerulescens*	13130	5,38	37	386	6
gi-120676-sp-P09094.1-G3PC_TOBAC	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2477	*Nicotiana tabacum*	35511	6,14	16	181	5
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2480	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	6	89	1
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2494	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	82	1
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2539	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	6	88	1
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2540	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	6	81	1
gi-20204-emb-CAA37290.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	2544	*Oryza sativa Japonica Group*	38786	8,5	3	68	1
gi-15222848	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2551	*Arabidopsis thaliana*	36890	6,67	9	141	2
gi-120668	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2552	*Hordeum vulgare*	33215	6,2	7	105	2
gi-2213867	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	2552	*Mesembryanthemum crystallinum*	38134	6,49	7	100	2
gi-34099812-gb-AAQ57193.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2554	*Panax ginseng*	31792	6,4	14	144	3
gi-74419004-gb-ABA03227.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2596	*Panax ginseng*	37070	7,67	17	212	3
gi-2213867	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	2596	*Mesembryanthemum crystallinum*	38134	6,49	4	87	1
gi-3913008	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	2597	*Cicer arietinum*	38428	6,21	10	185	
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2631	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	66	1
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2641	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	6	89	1
gi-147784332-emb-CAN70587.1-	triosephosphate isomerase (cytosolic)	Energy-Glycolysis	2643	*Vitis vinifera*	27181	6,34	5	50	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-glycolysis & Gluconegenesis									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-120676	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2648	*Nicotiana tabacum*	35511	6,14	12	169	3
gi|20551|emb|CAA42904.1|	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2652	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	6	95	1
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2653	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	82	1
gi-76573375-gb-ABA46792.1-	triosephosphate isomerase	Energy-Glycolysis	2662	*Solanum tuberosum*	27694	5,9	19	280	3
gi-15231715	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	2676	*Arabidopsis thaliana*	38516	6,05	11	121	2
gi-255586153	dihydroxyacetone kinase	Energy-Glycolysis	2722	*Ricinus communis*	61088	5,54	10	93	1
gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2768	*Ricinus communis*	47883	5,56	13	225	5
gi--gb-EEE80357.1-	phosphoglucose isomerase	Energy-Glycolysis	2775	*Populus trichocarpa*	67665	5,55	14	252	5
gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2776	*Ricinus communis*	47883	5,56	28	397	6
gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2781	*Ricinus communis*	47883	5,56	36	500	8
gi-533474-gb-AAA21277.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2784	*Mesembryanthemum crystallinum*	48308	5,62	12	178	3
gi-33415263-gb-AAQ18140.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2786	*Gossypium barbadense*	47702	6,16	3	80	1
gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2787	*Ricinus communis*	47883	5,56	31	554	8
gi-33415263-gb-AAQ18140.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2789	*Gossypium barbadense*	47702	6,16	3	102	1
gi-169540-gb-AAA63452.1-	phosphofructokinase	Energy-Glycolysis	2793	*Solanum tuberosum*	56452	6,21	4	109	2
gi-20372796-emb-CAC86122.1-	phosphoglucose isomerase (cytosolic)	Energy-Glycolysis	2807	*Clarkia modesta*	62766	6,42	15	145	4
gi-157358622-emb-CAO66298.1-	phosphofructokinase	Energy-Glycolysis	2812	*Vitis vinifera*	57389	7,12	5	91	2
gi-157358622-emb-CAO66298.1-	pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit	Energy-Glycolysis	2814	*Vitis vinifera*	57389	7,12	5	89	1
gi-3913711-sp-P81406.1-GAPN_PEA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2829	*Pisum sativum*	52970	6,76	16	283	4
gi-474168-emb-CAA49994.1-	phosphoglycerate mutase	Energy-Glycolysis	2832	*Nicotiana tabacum*	61029	5,98	2	89	1
gi-157343751-emb-CAO68257.1-	malate synthase	Energy-Gluconeogenesis	2836	*Vitis vinifera*	64149	6,72	5	152	3
gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2871	*Ricinus communis*	47883	5,56	30	377	7
gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	2872	*Ricinus communis*	47883	5,56	7	96	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-glycolysis & Gluconegenesis									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-1498232-emb-CAA52928.1-	phosphoglycerate mutase	Energy-Glycolysis	2881	*Prunus dulcis*	53361	5,38	11	198	4
gi-169540-gb-AAA63452.1-	pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase beta-subunit	Energy-Glycolysis	2882	*Solanum tuberosum*	56452	6,21	4	109	2
gi-12324763-gb-AAG52345.1-AC011663_24	phosphoglucomutase	Energy-Glycolysis	2909	*Arabidopsis thaliana*	63442	5,56	4	156	2
gi-15227561	enolase	Energy-Glycolysis	2922	*Arabidopsis thaliana*	51567	5,34	3	64	1
gi-224966968	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2943	*Ipomoea nil*	36843	6,77	30	464	7
gi-255644696	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	2943	*Glycine max*	36178	8,88	16	453	7
gi-18072801	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2945	*Capsicum annuum*	34464	6,19	42	648	9
gi-15231715	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	2946	*Arabidopsis thaliana*	38516	6,05	13	447	7
gi-34099812-gb-AAQ57193.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2947	*Panax ginseng*	31792	6,4	22	335	7
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2953	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	91	1
gi-211906450	phosphoglycerate kinase	Energy-Glycolysis	2956	*Gossypium hirsutum*	42237	5,97	11	237	4
gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	2558	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	4	164	2
gi-602426-gb-AAA86979.1-	phosphoglycerate mutase	Energy-Glycolysis	2987	*Mesembryanthemum crystallinum*	61145	5,39	1	75	1
gi-76573375	triosephosphate isomerase	Energy-Glycolysis	3036a	*Solanum tuberosum*	27694	5,9	9	331	4
gi-223532818-gb-EEF34593.1-	phosphoglucomutase	Energy-Glycolysis	3066	*Ricinus communis*	63215	5,53	16	214	5
gi-12324763-gb-AAG52345.1-AC011663_24	phosphoglucomutase	Energy-Glycolysis	3067	*Arabidopsis thaliana*	63442	5,56	5	159	2
gi-18072801	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	3145	*Capsicum annuum*	34464	6,19	33	589	8
gi-34099812-gb-AAQ57193.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	3146	*Panax ginseng*	31792	6,4	35	379	7
gi-15231715	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	3159	*Arabidopsis thaliana*	38516	6,05	7	312	3
gi-2213867	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	3159	*Mesembryanthemum crystallinum*	38134	6,49	2	47	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-glycolysis & Gluconegenesis									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-7529717-emb-CAB86897.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	3160	*Arabidopsis thaliana*	38516	6,05	9	243	4
gi-15231715	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	3168	*Arabidopsis thaliana*	38516	6,05	10	366	5

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-Pentoses phosphates & Respiration									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi|194708072,gi|75140229	transketolase	Energy-Pentoses phosphates	39	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	72 976,80		98,10%	1,48%	1
gi-151368158-gb-ABS10814.1-	transketolase (chloroplast)	Energy-Pentoses phosphates	2744	*Gossypium barbadense*	18417	5,68	7	73	1
gi-222848942-gb-EEE86489.1-	6-phosphogluconate dehydrogenase	Energy-Pentoses phosphates	2811	*Populus trichocarpa*	53601	6,93	26	332	6
gi-223529624-gb-EEF31571.1-	6-phosphogluconate dehydrogenase	Energy-Pentoses phosphates	2817	*Ricinus communis*	53769	6,51	30	530	10
gi-224079938	6-phosphogluconate dehydrogenase	Energy-Pentoses phosphates	2830	*Populus trichocarpa*	53601	6,93	21	520	9
gi-147766549-emb-CAN76421.1-	quinone oxidoreductase	Energy-Respiration	3091	*Vitis vinifera*	34376	6,03	8	98	3
gi-14787119	transketolase	Energy-Pentoses phosphates	3127	*Persicaria tinctoria*	67410	5,67	3	83	1
gi-3559814	transketolase	Energy-Pentoses phosphates	3128	*Capsicum annuum*	80056	6,16	1	88	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-TCA pathway									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-225460961	aconitase	Energy-TCA pathway	17	*Vitis vinifera*	109987	6,66	2	83	2
gi-211906490	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	20	*Gossypium hirsutum*	35531	6,1	8	84	1
gi-211906490	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	20A	*Gossypium hirsutum*	35531	6,1	20	198	3
gi-211906490	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	20B	*Gossypium hirsutum*	35531	6,1	18	245	3
gi-11133446	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	22	*Arabidopsis thaliana*	35652	6,33	26	333	5
gi-8778521-gb-AAF79529.1-AC023673_17	dihydrolipoamide dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2802	*Arabidopsis thaliana*	53752	6,96	18	280	4
gi-8778521-gb-AAF79529.1-AC023673_17	dihydrolipoamide dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2803	*Arabidopsis thaliana*	53752	6,96	11	297	4
gi-483510-emb-CAA52976.1-	citrate synthase (mitochondrial)	Energy-TCA pathway	2819	*Solanum tuberosum*	52578	8,11	6	106	3
gi-222865884-gb-EEF03015.1-	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2820	*Populus trichocarpa*	65106	6,32	8	83	2
gi-19171610-emb-CAD24779.1-	isocitrate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2822	*Cucumis sativus*	46147	6	32	390	8
gi-222848892-gb-EEE86439.1-	NADP-isocitrate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2828	*Populus trichocarpa*	46399	6,35	22	216	4
gi-1556429-emb-CAA59008.1-	citrate synthase	Energy-TCA pathway	2838	*Nicotiana tabacum*	52459	7,7	19	316	5
gi-8778521-gb-AAF79529.1-AC023673_17	dihydrolipoamide dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2868	*Arabidopsis thaliana*	53752	6,96	20	354	7
gi-8778521-gb-AAF79529.1-AC023673_17	dihydrolipoamide dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2873	*Arabidopsis thaliana*	53752	6,96	9	205	3
gi-2266947-gb-AAB80714.1-	phosphoenolpyruvate carboxylase	Energy-TCA pathway	2899	*Gossypium barbadense*	110115	5,95	6	145	3
gi-2145481-emb-CAA62747.1-	phosphoenolpyruvate carboxylase	Energy-TCA pathway	2900	*Welwitschia mirabilis*	107906	6,09	7	138	4
gi-13507108-gb-AAK28444.1-AF288382_1	phosphoenolpyruvate carboxylase	Energy-TCA pathway	2901	*Phaseolus vulgaris*	110640	6,22	6	297	5
gi-4210334	2-oxoglutarate dehydrogenase, E3 subunit	Energy-TCA pathway	2917	*Arabidopsis thaliana*	49987	6	3	65	1
gi-211906490	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2919	*Gossypium hirsutum*	35531	6,1	13	238	4
gi-126896	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2943	*Citrullus lanatus*	36178	8,88	16	453	7
gi-259661800	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2977	*Lepturus repens*	39796	5,24	18	337	5
gi-259661774	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2979	*Acroceras tonkinense*	39781	5,41	18	316	5

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Energy-TCA pathway									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-2150029	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2992	*Solanum lycopersicum*	64059	5,71	7	185	3
gi-228412	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	2992	*Populus trichocarpa x Populus deltoides*	64969	6,36	5	65	1
gi-115420	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	3037	*Phaseolus vulgaris*	64892	6,42	2	73	1
gi-3309243	aconitase	Energy-TCA pathway	3155	*Citrus limon*	98027	5,95	1	115	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Amino acids									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-126508780	cysteine synthase	Metabolism-Amino acids	2572a	*Glycine max*	34185	6,26	11	111	2
gi-126508780	cysteine synthase	Metabolism-Amino acids	2573a	*Glycine max*	34185	6,26	11	111	2
gi-223537310-gb-EEF38941.1-	histidinol dehydrogenase	Metabolism-Amino acids	2785	*Ricinus communis*	52027	5,78	11	175	2
gi-3157928-gb-AAC17611.1-	fumarylacetoacetate hydrolase	Metabolism-Amino acids	2790	*Arabidopsis thaliana*	44533	5,38	10	113	2
gi-115438917	acetohydroxy-acid reductoisomerase	Metabolism-Amino acids	2802	*Oryza sativa Japonica Group*	59644	5,73	10	329	5
gi-193290670	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase (E3 subunit)	Metabolism-Amino acids	2802	*Capsicum annuum*	53848	6,38	10	253	5
gi-147842465-emb-CAN63138.1-	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	Metabolism-Amino acids	2815	*Vitis vinifera*	47143	5,86	8	84	2
gi-223544386-gb-EEF45907.1-	aspartate aminotransferase	Metabolism-Amino acids	2832	*Ricinus communis*	48412	9,15	13	353	6
gi-225430011	aspartate aminotransferase	Metabolism-Amino acids	2835	*Ricinus communis*	49098	9,12	11	239	4
gi-168324-gb-AAA33408.1-	aspartate aminotransferase	Metabolism-Amino acids	2835	*Lupinus angustifolius*	45827	8,36	3	79	1
gi-223544386-gb-EEF45907.1-	aspartate aminotransferase	Metabolism-Amino acids	2838	*Ricinus communis*	48412	9,15	9	244	4
gi-52353541-gb-AAU44107.1-	acetohydroxy-acid reductoisomerase	Metabolism-Amino acids	2869	*Oryza sativa*	62338	6,01	3	107	2
gi-222847821-gb-EEE85368.1-	histidinol dehydrogenase	Metabolism-Amino acids	2874	*Populus trichocarpa*	47737	5,63	15	226	4
gi-8439545-gb-AAF74983.1-AF082893_1	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	2889	*Solanum tuberosum*	84613	5,93	8	202	4
gi-222850043-gb-EEE87590.1-	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	2890	*Populus trichocarpa*	84519	6,17	7	150	2
gi-974782-emb-CAA89019.1-	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	2891	*Solenostemon scutellarioides*	86717	6,17	19	532	9
gi-974782-emb-CAA89019.1-	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	2892	*Solenostemon scutellarioides*	86717	6,17	15	471	7
gi-974782-emb-CAA89019.1-	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	2893	*Solenostemon scutellarioides*	86717	6,17	13	211	4
gi-974782-emb-CAA89019.1-	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	2894	*Solenostemon scutellarioides*	86717	6,17	7	81	2
gi-1724102-gb-AAB38499.1-	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	Metabolism-Amino acids	2983	*Mesembryanthemum crystallinum*	53144	5,75	16	297	5
gi-1707955	glutamine synthetase	Metabolism-Amino acids	3014	*Vitis vinifera*	39175	5,79	11	239	4
gi-228456	glutamine synthetase	Metabolism-Amino acids	3014	*Arabidopsis thaliana*	46838	6,73	4	109	2
gi-126508780	cysteine synthase	Metabolism-Amino acids	3047	*Glycine max*	34185	6,26	9	153	2

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Amino acids									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-1929056-emb-CAA72805.1-	3,4-dihydroxy-2-butanone kinase	Metabolism-Cofactors (Riboflavin)	2722	*Solanum lycopersicum*	61762	5,15	7	147	2
gi-7387627	3,4-dihydroxy-2-butanone kinase	Metabolism-Cofactors (Riboflavin)	2722	*Solanum lycopersicum*	61762	5,15	9	320	5

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Lipids and sterols									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi|118489716	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	Metabolism-Lipids and sterols	37	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	41703,70		100,00%	8,90%	3
gi-9759429-dbj-BAB09916.1-	ATP citrate lyase	Metabolism-Lipids and sterols	2842	*Arabidopsis thaliana*	65786	7,54	9	146	3
gi-157327487-emb-CAO15468.1-	acyl-CoA synthetase	Metabolism-Lipids and sterols	2804	*Vitis vinifera*	56130	6,13	1	64	1
gi-223549898-gb-EEF51385.1-	acyl-CoA synthetase	Metabolism-Lipids and sterols	2804	*Ricinus communis*	55963	5,94	2	75	1
gi-9759429-dbj-BAB09916.1-	ATP citrate lyase	Metabolism-Lipids and sterols	2842	*Arabidopsis thaliana*	65786	7,54	9	146	3

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Nitrogen and sulfur									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
REVERSED_gi|159468317	arylsulfatase	Metabolism-Nitrogen and sulfur	41	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	70950,40		94,70%	1,69%	1
gi-7573371	nitrilase	Metabolism-Nitrogen and sulfur	547	*Arabidopsis thaliana*	34754	6,19	8	139	2
gi-22326744	nitrilase	Metabolism-Nitrogen and sulfur	2579	*Arabidopsis thaliana*	40305	8,79	15	159	3

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Nucleotides									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of ttal protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi|224100781,gi|255581753,gi|255637696	adenosine kinase	Metabolism-Nucleotides	45	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	37395,30		99,80%	3,52%	1
gi|224062736,gi|224085342,gi|225446855,gi|255582599,gi|270259914	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Metabolism-Nucleotides	49	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	36388,90		100,00%	12,70%	3
gi-222842607-gb-EEE80154.1-	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Metabolism-Nucleotides	415	*Populus trichocarpa*	36671	6,22	16	109	3
gi-224062736	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Metabolism-Nucleotides	415	*Populus trichocarpa*	36671	6,22	19	362	5
gi-62286916	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Metabolism-Nucleotides	486	*Arabidopsis thaliana*	37536	6,01	4	107	1
gi-2498076	nucleoside diphosphate kinase	Metabolism-Nucleotides	2904	*Helianthus annuus*	16206	6,3	13	115	2
gi-134672	nucleoside diphosphate kinase	Metabolism-Nucleotides	2904	*Pisum sativum*	16452	5,94	11	126	2

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Phosphate									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	11	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	74	181	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	20	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	38	125	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	20B	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	38	117	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	22	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	185	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	24	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	150	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	24	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	24	80	1
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	25	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	5	74	1
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	26	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	7	67	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	27	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	38	128	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	27	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	5	71	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	28	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	38	124	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	28	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	66	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	29	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	189	3
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	29	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	68	1
gi|29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	37	*Arabidopsis thaliana*	5759,30		99,80%	23,60%	1
gi|29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	44	*Arabidopsis thaliana*	5759,30		94,70%	23,60%	1
gi|29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	45	*Arabidopsis thaliana*	5759,30		99,90%	38,20%	2
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	364	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	16	122	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	372	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	74	179	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	502B	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	23	103	1
gi|57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2535	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	8	111	2
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2536	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	9	103	1
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2537	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	7	79	1
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2538	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	9	71	1
gi-29373999-gb-AAO72971.1-	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2539	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	23	87	1
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2539	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	9	84	1
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2540	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	61	1
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2540	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	7	98	1
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2541	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	7	98	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2553	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	23	68	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2574	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	183	3

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Phosphate									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2596	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	57	150	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2597	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	167	3
gi-29373999-gb-AAO72971.1-	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2612	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	60	137	3
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2668	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	69	1
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2670	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	51	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2676	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	216	3
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2676	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	8	131	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2679	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	41	146	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2679	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	5	89	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2681	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	41	160	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2681	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	8	127	2
gi-29373999-gb-AAO72971.1-	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2687	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	152	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2691	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	75	217	4
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2704	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	181	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2705	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	41	159	2
gi-29373999-gb-AAO72971.1-	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2711	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	181	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2716	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	67	136	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2722	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	75	211	4
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2753	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	98	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2753	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	18	65	1
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2763	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	12	167	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2763	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	32	86	2
gi-29373999-gb-AAO72971.1-	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2790	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	170	3
gi-29373999-gb-AAO72971.1-	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2794	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	187	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2827	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	51	192	4
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2833	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	41	166	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2833	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	8	129	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2834	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	252	3
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2834	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	83	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2837	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	74	249	4
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2837	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	9	124	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2886	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	41	121	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2886	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	8	116	2

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Phosphate									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-29373999-gb-AAO72971.1-	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2916	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	42	150	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2916a	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	52	137	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2916a	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	5	83	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2917b	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	85	220	4
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2922	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	9	121	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2923	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	158	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2924	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	38	131	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2924	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	71	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2956	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	74	205	4
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2967a	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	60	151	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2967b	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	41	141	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2967b	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	6	69	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2967c	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	74	182	4
gi-57868106-gb-AAW57408.1-	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2968	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	17	137	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2970	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	12	110	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2970	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	34	83	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2972	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	74	195	4
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2972	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	7	83	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2985	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	32	90	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2985	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	83	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2994	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	41	115	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	2995	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	219	3
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	2995	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	89	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3009	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	50	158	3
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	3025	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	75	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3039	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	23	102	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3047	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	38	123	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3050	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	23	102	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3051	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	42	126	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	3051	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	5	83	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3054	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	74	219	4
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	3054	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	9	142	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	3058	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	8	116	2
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3058	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	18	53	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Phosphate									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3060	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	32	117	2
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	3072	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	4	67	1
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3136	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	56	190	3
gi-57868106	p27SJ	Metabolism-Phosphate	3150	*Hypericum perforatum*	26209	6,56	12	195	3
gi-29373999	GLP-binding protein 1a	Metabolism-Phosphate	3150	*Arabidopsis thaliana*	5774	9,53	23	109	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Metabolism-Sugars and polysaccharides									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-166778	xyloglucan endo-1, 4-beta-D-glucanase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	17	*Arabidopsis thaliana*	28278	9,68	5	104	1
gi-60417424	alpha-galactosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	20	*Coffea arabica*	45849	6,33	14	297	5
gi-255645037	UDP-glucose:protein transglucosylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	20B	*Glycine max*	41479	5,66	11	183	4
gi-147810310	alpha-galactosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	20B	*Vitis vinifera*	42807	5,04	11	200	4
gi-60417424	alpha-galactosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	22	*Coffea arabica*	45849	6,33	14	309	5
gi-504489-gb-AAA33022.1-	alpha-galactosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	602	*Coffea arabica*	41284	5,6	17	257	4
gi-255565719	fucose synthetase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	625	*Ricinus communis*	35502	7,16	7	80	2
gi-70927645-gb-AAZ15705.1-	endo-alpha-1,4-glucanase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	1077	*Gossypium hirsutum*	68737	8,17	1	50	1
gi-927577	alpha-galactosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2681	*Phaseolus vulgaris*	47017	6,47	5	115	2
gi-3913031	beta-amylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2704	*Medicago sativa*	56104	5,34	4	110	2
gi-1212996-emb-CAA62689.1-	UDP-glucose pyrophosphorylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2711	*Hordeum vulgare subsp. vulgare*	51612	5,2	2	93	1
gi-2559006-gb-AAD04188.1-	beta-amylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2719	*Medicago sativa*	56104	5,34	4	65	2
gi-222837329-gb-EEE75708.1-	beta-amylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2720	*Populus trichocarpa*	58870	5,33	4	33	1
gi-116739148-gb-ABF22680.3-	alpha-L-arabinofuranosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2728	*Prunus persica*	74344	5,06	4	161	3
gi-116739148	alpha-L-arabinofuranosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2763	*Prunus persica*	74344	5,06	2	141	3
gi-223947323-gb-ACN27745.1-	UDP-glucose pyrophosphorylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2764	*Zea mays*	51327	5,72	18	348	6
gi-157341194-emb-CAO49101.1-	alpha-mannosidase (lysosomal)	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2782	*Vitis vinifera*	111795	5,54	3	138	3
gi-28190687-gb-AAO33160.1-AF493563_1	sucrose-phosphatase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2788	*Solanum lycopersicum*	47925	6,22	4	61	2
gi-222852477-gb-EEE90024.1-	glycosyl hydrolase family protein	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2848	*Populus trichocarpa*	60839	8,12	5	123	3
gi-223540518-gb-EEF42085.1-	UDP-n-acteylglucosamine pyrophosphorylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2872	*Ricinus communis*	68725	5,9	6	156	3
gi-1212996-emb-CAA62689.1-	UDP-glucose pyrophosphorylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2873	*Hordeum vulgare subsp. vulgare*	51612	5,2	2	95	1
gi-223547851-gb-EEF49343.1-	alpha-mannosidase (lysosomal)	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2883	*Ricinus communis*	109909	5,83	3	110	2
gi-224099005	alpha-1,4-glucan-protein synthase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2917b	*Populus trichocarpa*	49987	6,25	13	304	6
gi-2492782	alpha-galactosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	2917b	*Coffea arabica*	41284	5,6	18	201	4

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Cell growth et Cell structure									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
gi-159895414	actin	Cell structure-Cytoskeleton	19a	*Ziziphus jujuba*	17548	4,65	14	59	1
gi-116057804-emb-CAL54007.1-	myosin (class II heavy chai	Cell structure-Cytoskeleton	929	*Ostreococcus tauri*	466900	6,17	0	50	1
gi-460761-emb-CAA50750.1-	fibrillin	Cell structure-Chloroplast	2749	*Capsicum annuum*	35238	5,08	4	81	1
gi-223529961-gb-EEF31888.1-	proliferation-associated 2g4 (EBP1)	Cell growth/division-Cell cycle	2773	*Ricinus communis*	43344	6,31	17	267	5
gi-217073888-gb-ACJ85304.1-	proliferation-associated 2g4 (EBP1)	Cell growth/division-Cell cycle	2777	*Medicago truncatula*	43483	5,9	7	48	1
gi-226493041	actin	Cell structure-Cytoskeleton	2916b	*Zea mays*	41653	5,3	26	448	8
gi-116060488	kinesin	Cell structure-Cytoskeleton	2995	*Ostreococcus tauri*	88252	5,54	1	101	2
gi-22857914	actin	Cell structure-Cytoskeleton	3070	*Nicotiana tabacum*	15793	5,29	8	78	1

Albumines P. douarrei (graine entière) : Disease/Defence-Detoxification									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (<40)	Nb peptides
gi-58578272	glutathione S-transferase	Disease/Defence-Detoxification	30	*Capsicum chinense*	25537	5,79	10	186	4
gi-58578272	glutathione S-transferase	Disease/Defence-Detoxification	31	*Capsicum chinense*	25537	5,79	10	184	4
gi-3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	33	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	7	86	2
gi-2853219	glutathione S-transferase	Disease/Defence-Detoxification	34	*Carica papaya*	25358	5,78	11	198	4
gi|3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	36	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	26 259,00		99,80%	7,92%	2
gi|118485163,gi|224065178,gi|25564153 7,gi|28313 5904,gi|66732627,gi|68131811	dehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	39	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	30 009,60		99,90%	7,41%	2
gi|225444485,gi|270234633	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	42	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	33 097,80		100,00%	9,59%	2
gi|224143607	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	43	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	31645,40		99,80%	3,90%	1
gi-217072032-gb-ACJ84376.1-	aldo/keto reductase	Disease/Defence-Detoxification	855	*Medicago truncatula*	26363	5,22	13	124	2
gi-6006619-emb-CAB56851.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	929	*Prunus persica*	25439	8,62	17	68	1
gi-222833311-gb-EEE71788.1-	oxalate oxidase	Disease/Defence-Detoxification	997	*Populus trichocarpa*	21530	5,5	4	65	1
gi-119367465-gb-ABL67649.1-	thioredoxin-dependent peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	1345	*Citrus cv. Shiranuhi*	17329	5,15	21	106	2
gi-3719457-gb-AAC63379.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	2620	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	17	44	2
gi-157328520-emb-CAO21229.1-	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	2625	*Vitis vinifera*	33094	5,5	25	236	4
gi-50058092-dbj-BAD27392.1-	dehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2626	*Zinnia elegans*	24042	5,47	10	69	1
gi|3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	2626	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	11	75	2
gi-17155160	germin-like protein	Disease/Defence-Detoxification	2629	*Arabidopsis thaliana*	21779	5,81	11	62	1
gi-6006619-emb-CAB56851.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	2633	*Prunus persica*	25439	8,62	17	68	1
gi-66732627	dehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2662	*Lotus japonicus*	29082	7,75	3	85	2
gi-225444485	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	2669	*Vitis vinifera*	33094	5,5	23	432	6
gi-194716776-gb-ACF93237.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2747	*Picrorhiza kurrooa*	52700	6,87	4	103	2
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2748	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	9	169	3
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2792	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	14	172	3
gi-194690106-gb-ACF79137.1-	oxalyl-CoA decarboxylase	Disease/Defence-Detoxification	2800	*Zea mays*	60219	6,05	3	62	1
gi-153204 19-dbj-BAB63925.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2810	*Spinacia oleracea*	53978	6,65	4	105	2

Albumines P. douarrei (graine entière) : Disease/Defence-Detoxification									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (<40)	Nb peptides
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2821	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	12	222	3
gi-117067068	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2821	*Acanthus ebracteatus*	46552	5,33	11	238	4
gi-15865451-emb-CAC82727.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2839	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	8	125	2
gi-225440936	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2840	*Vitis vinifera*	47293	6,32	11	343	6
gi-15865451	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2840	*Mesembryanthemum crystallinum*	51716	6,38	11	153	3
gi-14031049	peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	2903	*Nicotiana tabacum*	39039	5,99	9	306	4
gi-1389835	peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	2903	*Linum usitatissimum*	38171	8,07	7	194	3
gi-146432261	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2905	*Vitis vinifera*	47250	5,93	3	97	1
gi-146432261	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2914	*Vitis vinifera*	47250	5,93	5	95	1
gi-146432261	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	2917	*Vitis vinifera*	47250	5,93	4	105	1
gi-2213425	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3025	*Citrus x paradisi*	32623	5,46	27	555	8
gi-147783624	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3025	*Vitis vinifera*	37361	5,86	3	82	1
gi-147778328	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3026	*Vitis vinifera*	41644	5,3	9	145	3
gi-2213425	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3026	*Citrus x paradisi*	32623	5,46	8	121	2
gi-3719457	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	3035	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	12	170	3
gi-224143607	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	3046	*Populus trichocarpa*	31642	5,26	17	269	5
gi-38228697-emb-CAE54085.1-	superoxide dismutase	Disease/Defence-Detoxification	3077	*Fagus sylvatica*	16714	6,27	6	118	2
gi-220898263	superoxide dismutase (Cu-Zn)	Disease/Defence-Detoxification	3078	*Ginkgo biloba*	21830	6,75	18	304	5
gi-586004	superoxide dismutase	Disease/Defence-Detoxification	3080	*Ipomoea batatas*	15072	5,64	13	93	2
gi-12744890	superoxide dismutase (Cu-Zn)	Disease/Defence-Detoxification	3080	*Avicennia marina*	15272	5,77	8	55	1
gi-119367465	thioredoxin-dependent peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	3082	*Citrus hybrid cultivar*	17329	5,15	11	152	3
gi-14031049-gb-AAK52084.1-	peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	3156	*Nicotiana tabacum*	39039	5,99	7	185	3

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Signal transduction/Transcription-mRNA processing/ Secondary metabolism-Terpenoids/Secondary metabolism-Phenylpropanoids/phenolics									
NCBI accession N°	**Protein name**	**Function category-Function description**	**Spot number**	**Organism**	**theor MM (Da)**	**theor pI**	**Covering (%)**	**Score (>40)**	**Nb peptides**
gi-585777	Ras-related nuclear protein 1	Signal transduction	15	*Solanum lycopersicum*	25170	6,25	30	395	7
gi-33323037	jacalin-like lectin	Signal transduction	35	*Ananas comosus*	15468	6,26	60	255	5
gi|224062966,gi|242077810	protein phosphatase 2c (RAB18 homolog)	Signal transduction	38	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	23 811,30		100,00%	16,30%	3
gi|255647044	annexin	Signal transduction	48	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	25 078,40		100,00%	9,09%	2
gi-242077810	Rab18/RabC-family small GTPase	Signal transduction	997	*Sorghum bicolor*	23813	5,43	16	158	3
gi-87046109	RAN2 small Ras GTP-binding nuclear protein	Signal transduction	2546	*Allium cepa*	25040	6,6	21	125	3
gi-585777	Ras-related nuclear protein 1	Signal transduction	2551	*Solanum lycopersicum*	25170	6,25	20	167	4
gi-1184989	small GTP-binding protein/GTPase SAR2	Signal transduction	2648	*Nicotiana tabacum*	15827	5,8	22	101	2
gi-45775566	maturase K	Transcription-mRNA processing	2662	*Forchhammeria sessilifolia*	59793	9,53	1	68	1
gi-222847826-gb-EEE85373.1-	GTP-binding protein	Signal transduction	2823	*Populus trichocarpa*	44698	6,4	10	215	5
gi|1346030,gi|15141501 9,gi|32329199,gi|4324960,gi|4894899,gi|6016044	farnesyl diphosphate synthase	Secondary metabolism-Terpenoids	45	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	39 403,60		99,90%	7,29%	2
gi-4097522-gb-AAD10327.1-	cinnamyl alcohol dehydrogenase	Secondary metabolism-Phenylpropanoids/phenolics	2650	*Fragaria x ananassa*	39112	6,46	3	61	1
gi-468748-emb-CAA54495.1-	capsanthin/capsorubin synthase	Secondary metabolism-Terpenoids	2746	*Capsicum annuum*	56622	8,77	4	105	2
gi-6522567-emb-CAB62011.1-	4-coumarate-CoA ligase	Secondary metabolism-Phenylpropanoids/phenolics	2804	*Arabidopsis thaliana*	55510	6,08	6	55	1

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Protein synthesis translation factors/Protein synthesis-tRNA synthetases									
NCBI accession N°	**Protein name**	**Function category-Function description**	**Spot number**	**Organism**	**theor MM (Da)**	**theor pI**	**Covering (%)**	**Score (>40)**	**Nb peptides**
gi|224127856,gi|242072552	eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit	Protein synthesis-Translation factors	44	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	59 002,70		94,70%	2,04%	1
gi|223535993|gb|EEF37652.1|	elongation factor tu	Protein synthesis-Translation factors	2546	*Ricinus communis*	49002	6,62	4	94	2
gi-115446385	elongation factor EF-2	Protein synthesis-Translation factors	2572b	*Oryza sativa Japonica Group*	93961	5,85	4	196	4
gi-115446385	elongation factor EF-2	Protein synthesis-Translation factors	2573b	*Oryza sativa Japonica Group*	93961	5,85	4	196	4
gi-19773452-dbj-BAB86847.1-	elongation factor EF-3	Protein synthesis-Translation factors	2831	*Pisum sativum*	54996	5,87	5	91	3
gi-225462164-ref-XP_002266780.1-	elongation factor EF-2	Protein synthesis-Translation factors	2897	*Vitis vinifera*	93918	5,8	18	612	12
gi-38344860-emb-CAE01286.2-	elongation factor EF-2	Protein synthesis-Translation factors	2898	*Oryza sativa*	93913	5,85	9	197	6
gi-148524165	elongation factor 1-alpha	Protein synthesis-Translation factors	2995	*Spirogyra sp. FWAC125*	30626	8,14	8	102	2
gi-13094963	initiation factor eIF5-A	Protein synthesis-Translation factors	3082	*Manihot esculenta*	17588	5,6	7	48	1
gi-225450981	seryl-tRNA synthetase	Protein synthesis-tRNA synthetases	3136	*Vitis vinifera*	51093	6,27	8	162	3

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Protein destination and storage-Storage proteins									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (>40)	Nb peptides
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	6a	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	59	1
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	7	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	59	1
gi-793854	legumin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	9	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	59	1
gi|82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	42	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	52 529,60		99,80%	2,81%	2
gi|82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	43	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	52 529,60		99,80%	2,81%	2
gi|82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	44	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	52 529,60		99,80%	2,81%	2
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	982	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	80	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	997	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	63	1
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	997	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	124	2
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	1071	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	131	2
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	1071	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	68	1
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	1071	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	104	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	1160	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	154	2
gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	1298	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	57	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	1368	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	44	1
gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	1368	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	57	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	1596	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	52	1
gi-147804830-emb-CAN66879.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2052	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	55	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2545	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	137	2
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2545	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	140	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2546	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	116	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2551	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	135	2
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2554	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	159	2

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Protein destination and storage-Storage proteins									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (>40)	Nb peptides
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2556	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	86	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2582	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	133	2
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2623	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	56	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2627	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	56	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2627	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	0	61	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2628	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	51	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2639	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	60	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2650	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	63	2
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2657	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	47	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2660	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	63	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2662	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	0	61	1
gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	2783	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	59	1
gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	2816	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	59	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2905	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	62	1
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	2974	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	52	1
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	3027	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	53	1
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	3028	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	124	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	3029	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	60	1
gi-793854	legumin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	3070	*magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	58	1
gi-118340979	7S globulin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	3075	*Ficus pumila var. awkeotsang*	56694	8,22	2	68	1
gi-82469930	7S globulin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	3076b	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	111	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	3097	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	51	1
gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	3098	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	110	2

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Protein destination and storage-Storage proteins									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (>40)	Nb peptides
gi-118340979	7S globulin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	3134	*Ficus pumila var. awkeotsang*	56694	8,22	2	58	1
gi-118340979	7S globulin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	3135	*Ficus pumila var. awkeotsang*	56694	8,22	2	68	1
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	3155	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	126	2
gi-82469930	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	3156	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	116	2

Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Protein destination and storage-Proteolysis									
NCBI accession N°	**Protein name**	**Function category-Function description**	**Spot number**	**Organism**	**theor MM (Da)**	**theor pI**	**Covering (%)**	**Score (>40)**	**Nb peptides**
gi-168011125	polyubiquitin	Protein destination and storage-Proteolysis	8	*Physcomitrella patens subsp. patens*	78155	7,03	0	55	1
gi-168011125	polyubiquitin	Protein destination and storage-Proteolysis	16	*Physcomitrella patens subsp. patens*	78155	7,03	0	66	1
gi-2463584	cysteine proteinase	Protein destination and storage-Proteolysis	35	*Ananas comosus*	39535	8	18	311	5
gi-13432122	cysteine proteinase	Protein destination and storage-Proteolysis	35	*Ananas comosus*	38224	8,62	23	249	5
gi-26224736-gb-AAN76362.1-	serpin-like protein	Protein destination and storage-Proteolysis	415	*Citrus x paradisi*	42404	6,04	5	137	2
gi-168032696	26S proteosome regulatory subunit	Protein destination and storage-Proteolysis	656	*Physcomitrella patens subsp. patens*	66534	9,33	1	49	1
gi-168011125	polyubiqutin	Protein destination and storage-Proteolysis	2570	*Physcomitrella patens subsp. patens*	78155	7,03	0	55	1
gi-168032696	26S proteosome regulatory subunit	Protein destination and storage-Proteolysis	2571	*Physcomitrella patens subsp. patens*	66534	9,33	1	52	1
gi-162690710-gb-EDQ77076.1-	ubiquitin family protein	Protein destination and storage-Proteolysis	2646	*Physcomitrella patens subsp. patens*	78155	7,03	0	61	1
gi-26224736-gb-AAN76362.1-	serpin-like protein	Protein destination and storage-Proteolysis	2682	*Citrus x paradisi*	42404	6,04	2	54	1
gi-9759033-dbj-BAB09360.1-	serine peptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2745	*Arabidopsis thaliana*	75376	5,08	4	61	1
gi-25083482-gb-AAN72085.1-	aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2751	*Arabidopsis thaliana*	99096	5,43	7	225	5
gi-222841937-gb-EEE79484.1-	aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2751	*Populus trichocarpa*	106254	5,67	-14	491	9
gi-147772895	aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2752	*Vitis vinifera*	98859	5,29	5	365	6
gi-147772895	aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2753	*Vitis vinifera*	98859	5,29	4	251	4
gi-4455323-emb-CAB36783.1-	aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2754	*Arabidopsis thaliana*	97224	5,26	1	93	1
gi-16394-emb-CAA45040.1-	leucine aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2756	*Arabidopsis thaliana*	54475	5,66	7	270	3
gi-16394-emb-CAA45040.1-	leucine aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2757	*Arabidopsis thaliana*	54475	5,66	7	252	3
gi-157343187-emb-CAO66676.1-	aminopeptidase (cytosolic)	Protein destination and storage-Proteolysis	2758	*Vitis vinifera*	60704	6,69	16	429	6
gi-116788543-gb-ABK24916.1-	prolyl carboxypeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2779	*Picea sitchensis*	54535	5,63	2	56	1
gi-116788543-gb-ABK24916.1-	peptidase S28 family	Protein destination and storage-Proteolysis	2780	*Picea sitchensis*	54535	5,63	4	70	1
gi-10140734-gb-AAG13567.1-AC073867_13	serine peptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2808	*Oryza sativa*	56087	8,7	2	64	1

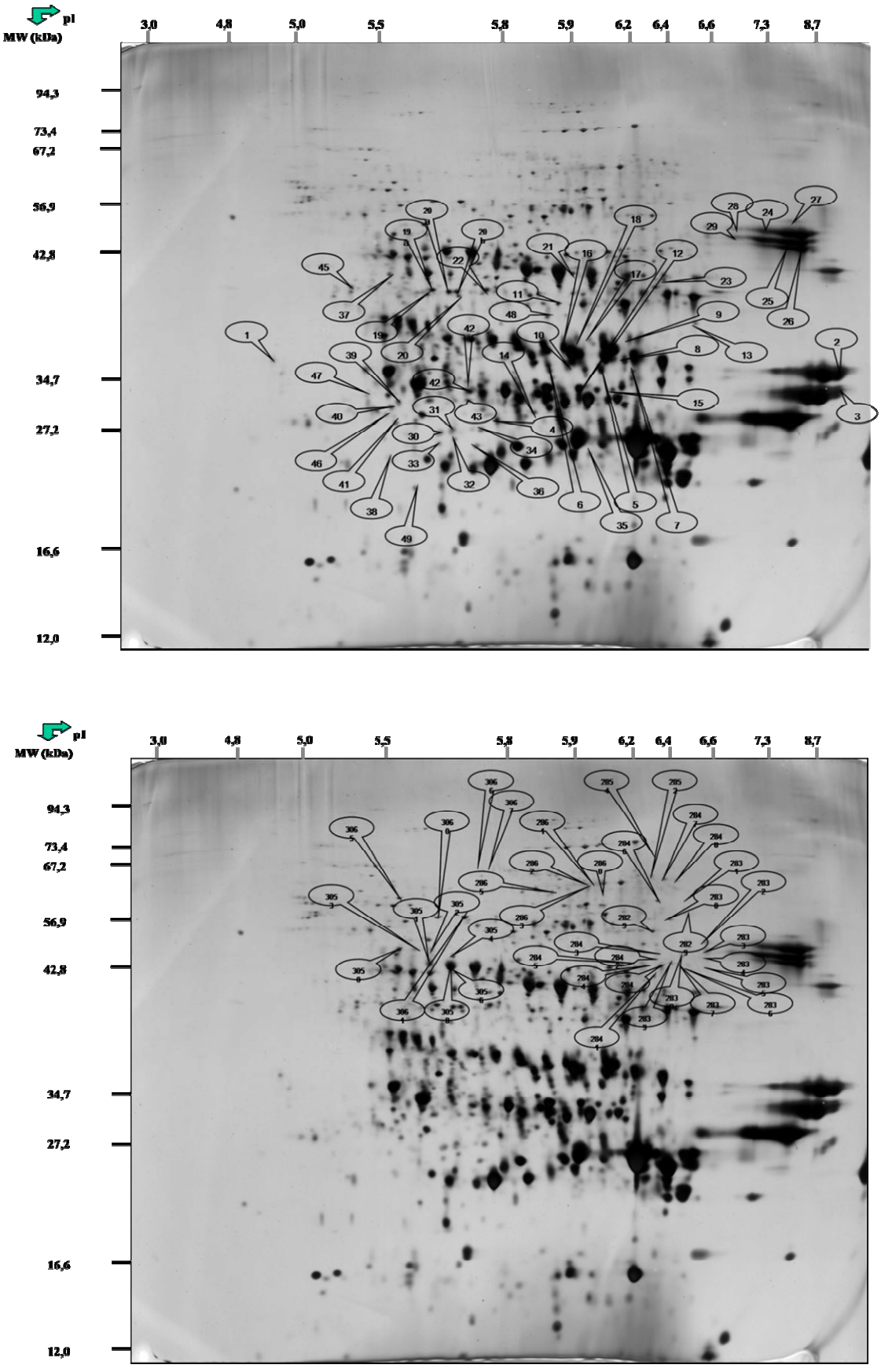
Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Protein destination and storage-Proteolysis									
NCBI accession N°	**Protein name**	**Function category-Function description**	**Spot number**	**Organism**	**theor MM (Da)**	**theor pI**	**Covering (%)**	**Score (>40)**	**Nb peptides**
gi-10140734-gb-AAG13567.1-AC073867_13	serine peptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	2867	*Oryza sativa*	56087	8,7	2	54	1
gi-12320817-gb-AAG50548.1-AC074228_3	aminoacylase	Protein destination and storage-Proteolysis	2873	*Arabidopsis thaliana*	48575	6,2	4	47	1
gi-225458493	serpin-like protein	Protein destination and storage-Proteolysis	2970	*Vitis vinifera*	41988	5,66	4	137	2
gi-168011125	polyubiqutin	Protein destination and storage-Proteolysis	3133	*Physcomitrella patens subsp. patens*	78155	7,03	0	67	1

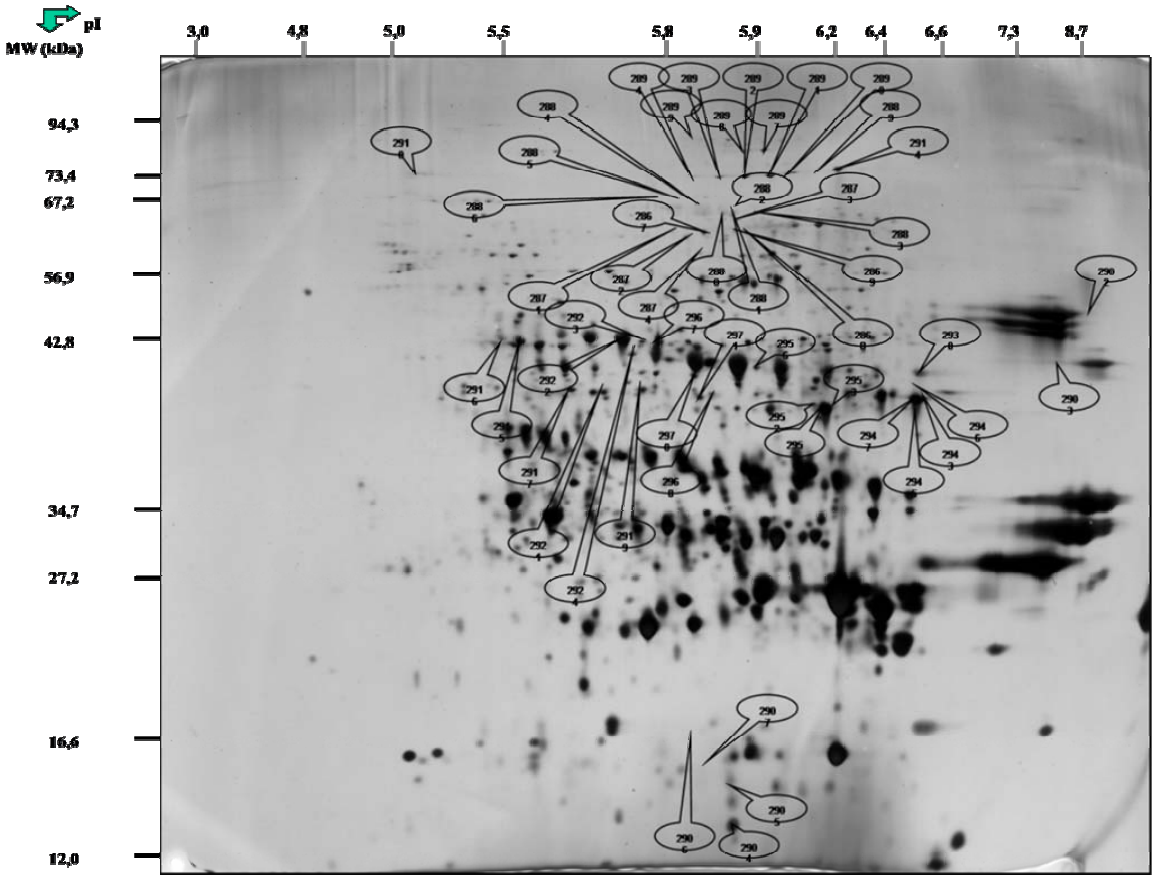
Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Protein destination and storage-Folding and stability									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (>40)	Nb peptides
gi|425194	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Folding and stability	40	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	70 852,60		99,90%	2,63%	2
REVERSED_gi|242085674,gi|115470124	heat shock protein (HSP90)	Protein destination and storage-Folding and stability	41	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	85 313,50		95,00%	1,41%	1
gi-148910696	heat shock protein (HSP70 cytosolic)	Protein destination and storage-Folding and stability	372	*Picea sitchensis*	71266	5,07	10	273	5
gi-157344266-emb-CAO69199.1-	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Folding and stability	705	*Vitis vinifera*	71126	5,17	18	384	5
gi-169296-gb-AAA33748.1-	heat shock protein (HSP83)	Protein destination and storage-Folding and stability	717	*Ipomoea nil*	80770	4,95	1	82	1
gi-169296-gb-AAA33748.1-	heat shock protein (HSP83)	Protein destination and storage-Folding and stability	951	*Ipomoea nil*	80770	4,95	1	85	1
gi-147798422	heat shock protein (HSP18.6)	Protein destination and storage-Folding and stability	1513	*Vitis vinifera*	18136	6,17	6	53	1
gi-223540303-gb-EEF41874.1-	heat shock protein (HSP26)	Protein destination and storage-Folding and stability	2620	*Ricinus communis*	17505	5,34	22	139	4
gi-99033683-gb-ABF61863.1-	chaperonin	Protein destination and storage-Folding and stability	2630	*Agave tequilana*	18415	6,2	22	96	3
gi-222851439-gb-EEE88986.1-	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Folding and stability	2682	*Populus trichocarpa*	62069	5,28	5	57	1
gi-1134968-gb-AAB05641.1-	protein disulphide isomerase	Protein destination and storage-Folding and stability	2695	*Ricinus communis*	55526	4,95	2	53	1
gi-1134968-gb-AAB05641.1-	protein disulphide isomerase	Protein destination and storage-Folding and stability	2696	*Ricinus communis*	55526	4,95	2	58	1
gi-11134159-sp-Q9SRG3.1-PDI2_ARATH	protein disulphide isomerase	Protein destination and storage-Folding and stability	2697	*Arabidopsis thaliana*	56329	4,9	5	72	2
gi-223546830-gb-EEF48327.1-	protein disulphide isomerase	Protein destination and storage-Folding and stability	2698	*Ricinus communis*	55475	4,91	6	90	2
gi-225433375-ref-XP_002285608.1-	chaperonin (GroEL-like)	Protein destination and storage-Folding and stability	2715	*Vitis vinifera*	61331	5,85	4	77	1
gi-92882356-gb-ABE86687.1-	chaperonin (GroEL-like)	Protein destination and storage-Folding and stability	2715	*Medicago truncatula*	61074	6,27	23	394	7
gi-186898205	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Folding and stability	2716bis	*Hevea brasiliensis*	71694	5,27	17	483	8
gi-255545368	protein disulphide isomerase	Protein destination and storage-Folding and stability	2721	*Ricinus communis*	55475	4,91	5	246	4
gi-186898205	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Folding and stability	2723	*Hevea brasiliensis*	71694	5,27	15	475	8
gi-27476086	heat shock protein (HSP70 mitochondrial)	Protein destination and storage-Folding and stability	2725	*Oryza sativa Japonica Group*	70403	5,46	12	460	8
gi-217074464-gb-ACJ85592.1-	peptidylprolyl isomerase	Protein destination and storage-Folding and stability	2727	*Medicago truncatula*	55529	5,01	2	67	1
gi-20835-emb-CAA38536.1-	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Folding and stability	2729	*Pisum sativum*	72257	5,81	8	91	2

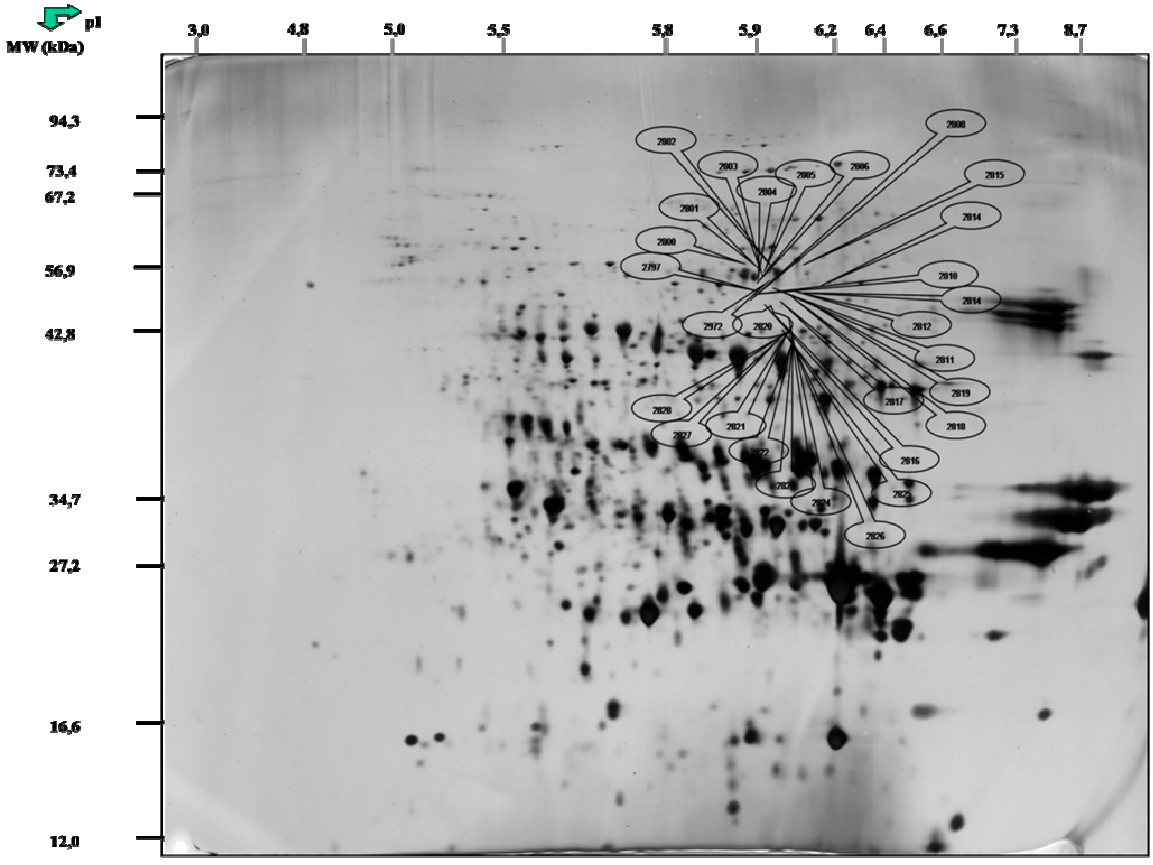
Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Unclear/Unknown									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (>40)	Nb peptides
gi-9622153	short-chain dehydrogenase/reductase	Unclear	9	*Glycine max*	31747	6,6	7	141	2
gi-255638886	allyl alcohol dehydrogenase	Unclear	11	*Glycine max*	37798	6,61	10	229	3
gi-9622153	short-chain dehydrogenase/reductase	Unclear	17	*Glycine max*	31747	6,6	7	126	2
gi-9622153	short-chain dehydrogenase/reductase	Unclear	18	*Glycine max*	31747	6,6	7	128	2
gi-9622153	short-chain dehydrogenase/reductase	Unclear	19	*Glycine max*	31747	6,6	5	73	1
REVERSED_gi|255083929	unknown protein	Unknown	41	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	115 628,30		95,00%	0,99%	1
gi|255088497	short-chain dehydrogenase/reductase	Unclear	41	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	39 291,30		95,00%	3,07%	1
gi|224031935,gi|242083784	unknown protein	Unknown	44	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	36 284,10		94,70%	2,87%	1
REVERSED_gi|225461132,REVERSED_gi|270231177	hypothetical protein	Unknown	44	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	89 465,10		94,70%	1,00%	1
gi|255645019	dienelactone hydrolase family protein	Unclear	46	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	26 356,80		99,90%	9,05%	1
gi|255645019	dienelactone hydrolase family protein	Unclear	47	*ViP_DCpNC_FD_20100216.fasta*	26 356,80		98,70%	9,05%	1
gi-9622153-gb-AAF89645.1-AF169018_1	short-chain dehydrogenase/reductase	Unclear	912	*Glycine max*	31747	6,6	12	109	2
gi-226514844-gb-ACO60840.1-	predicted protein	Unknown	2571	*Micromonas sp. RCC299*	134096	5,08	0	49	1
gi-26451037-dbj-BAC42624.1-	unknown protein	Unknown	2628	*Arabidopsis thaliana*	26684	5,79	4	55	1
gi-32489512	hypothetical protein	Unknown	2655	*Oryza sativa Japonica Group*	97146	5,46	1	48	1
gi-255547083	hypothetical protein	Unknown	2661	*Ricinus communis*	35264	4,99	2	43	1
gi-172046673-sp-P85485.1-UP01_PINHA	unknown protein	Unknown	2704	*Pinus halepensis*	1031	4,03	100	60	1
gi-172046673-sp-P85485.1-UP01_PINHA	unknown protein	Unknown	2705	*Pinus halepensis*	1031	4,03	100	60	1
gi-172046673-sp-P85485.1-UP01_PINHA	unknown protein	Unknown	2706	*Pinus halepensis*	1031	4,03	100	54	1
gi-18839-emb-CAA39880.1-	rubber elongation factor	Unclear	2724	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	7	71	1
gi-57899962-dbj-BAD87898.1-	LRK1 protein	Unclear	2742	*Oryza sativa*	113721	6,57	1	57	1
gi-18839-emb-CAA39880.1-	rubber elongation factor	Unclear	2760	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	7	62	1
gi-18839-emb-CAA39880.1-	rubber elongation factor	Unclear	2777	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	7	68	1
gi-18839-emb-CAA39880.1-	rubber elongation factor	Unclear	2801	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	41	253	5
gi-223527604-gb-EEF29718.1-	predicted protein	Unknown	2809	*Ricinus communis*	163109	5,95	0	50	1

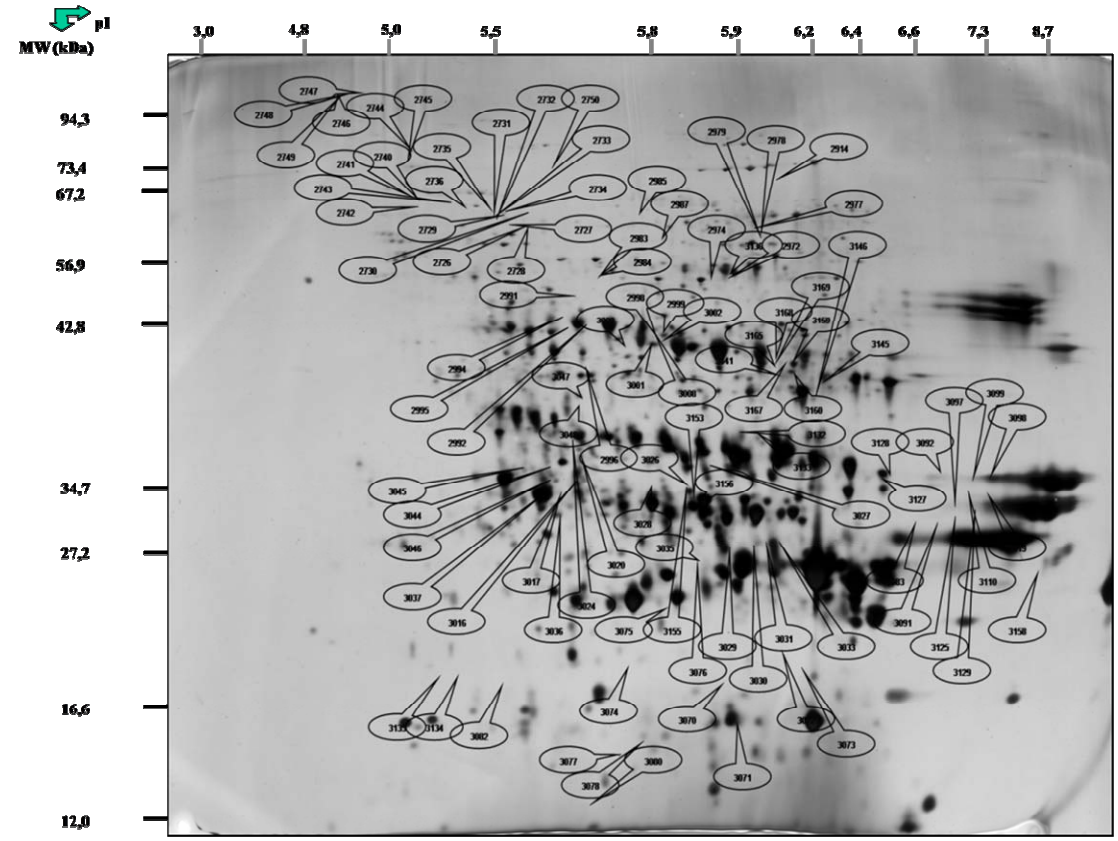
Albumines *P. douarrei* (graine entière) : Unclear/Unknown									
NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Spot number	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (%)	Score (>40)	Nb peptides
gi-18839-emb-CAA39880.1-	rubber elongation factor	Unclear	2869	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	7	62	1
gi-147799701-emb-CAN68360.1-	hypothetical protein	Unknown	2884	*Ipomoea nil*	139620	7,07	0	30	1
gi-147804830-emb-CAN66879.1-	hypothetical protein	Unknown	2904	*Vitis vinifera*	122492	7,99	0	45	1
gi-147789503	hypothetical protein	Unknown	3097	*Vitis vinifera*	109264	9,01	0	47	1
gi-242094448	hypothetical protein	Unknown	3097	*Sorghum bicolor*	67969	8,18	1	55	1
gi-9622153	short-chain dehydrogenase/reductase	Unclear	3132	*Glycine max*	31747	6,6	4	75	1
gi-226514844-gb-ACO60840.1-	hypothetical protein	Unknown	3156	*Micromonas sp. RCC299*	134096	5,08	0	49	1

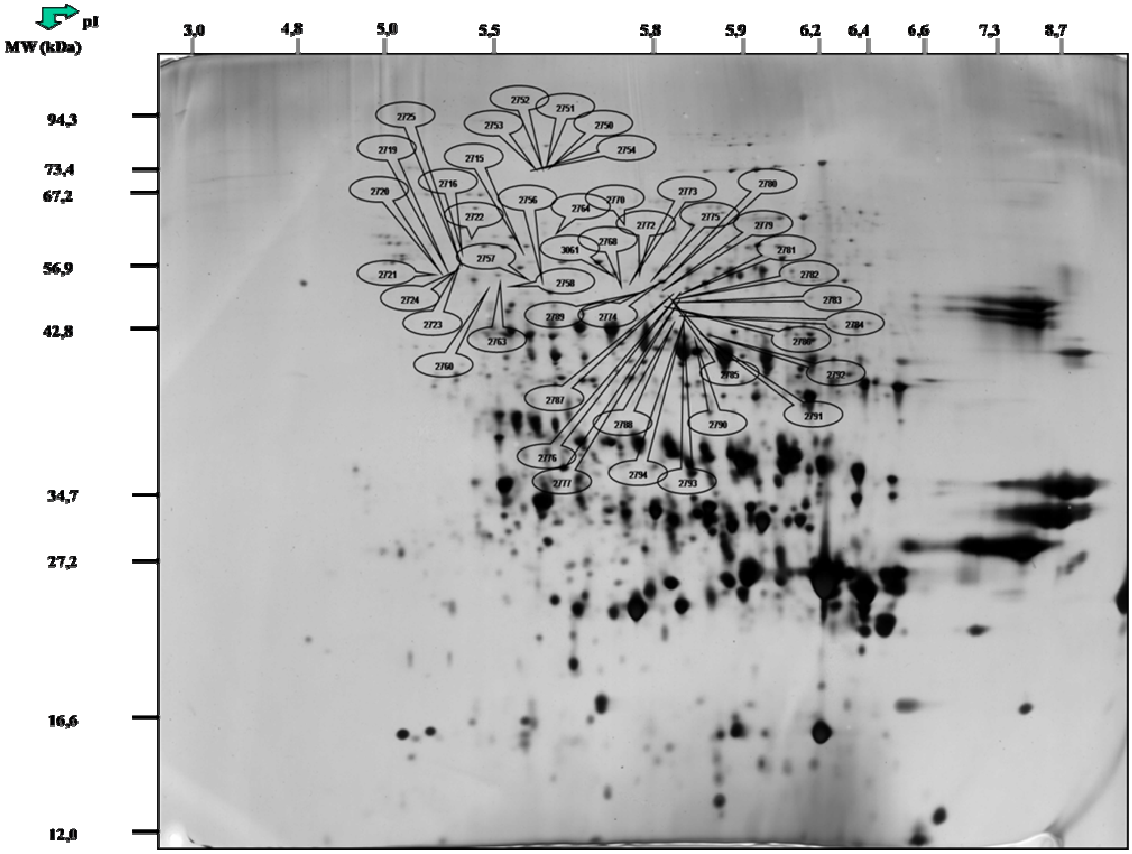
Figure S2 : Carte protéomique de la fraction albumine de la graine mature sèche de *Psychotria douarrei*

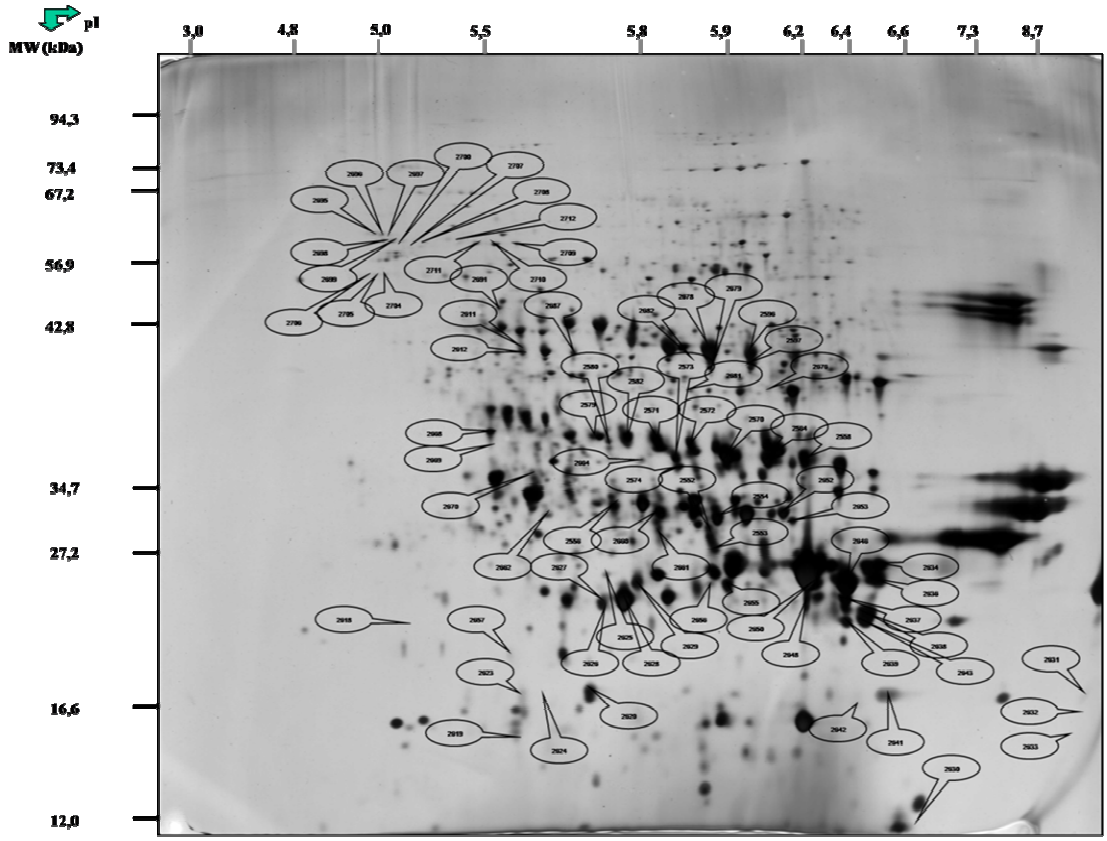


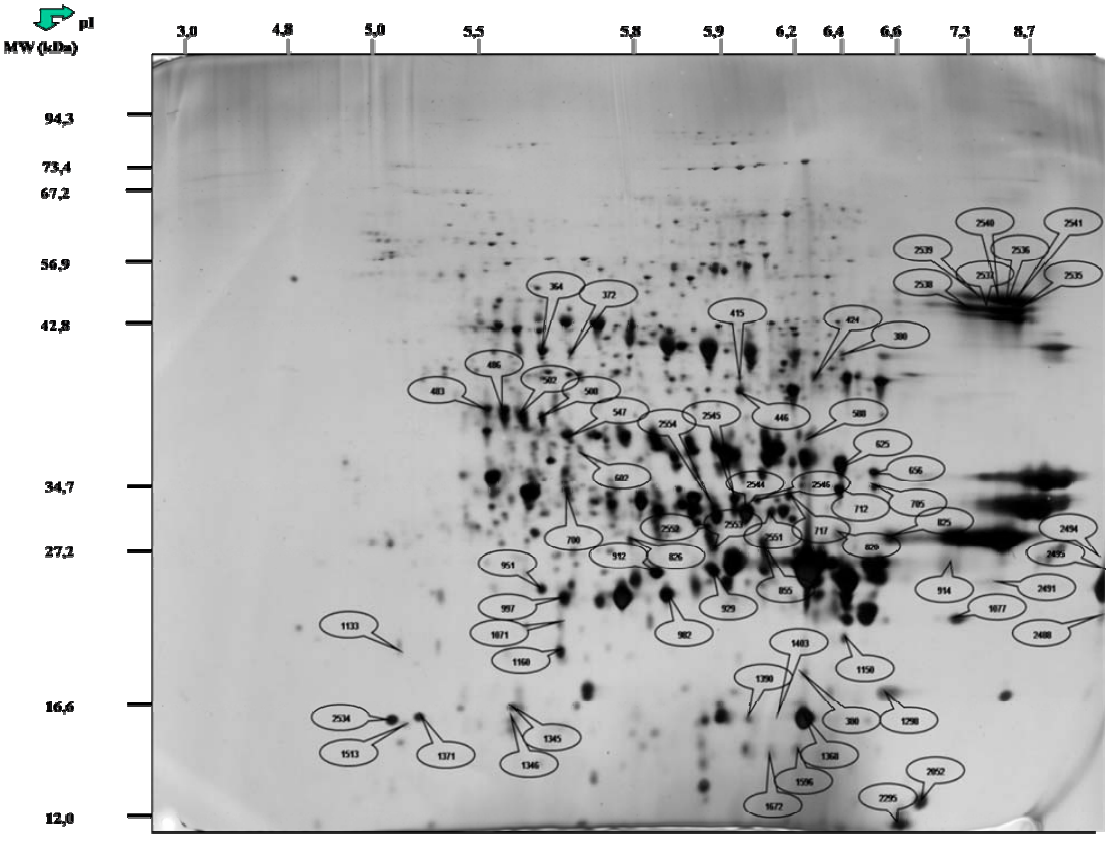

pI
MW (kDa)
3,0
4,8
5,0
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,0


pI
MW (kDa)
3,0
4,8
5,0
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,0


pI
MW (kDa)
3,0
4,8
5,0
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,0


pI
MW (kDa)
3,0
4,8
5,0
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,0


pI
MW (kDa)
3,0
4,8
5,0
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,0


pI
MW (kDa)
3,0
4,8
5,0
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,0

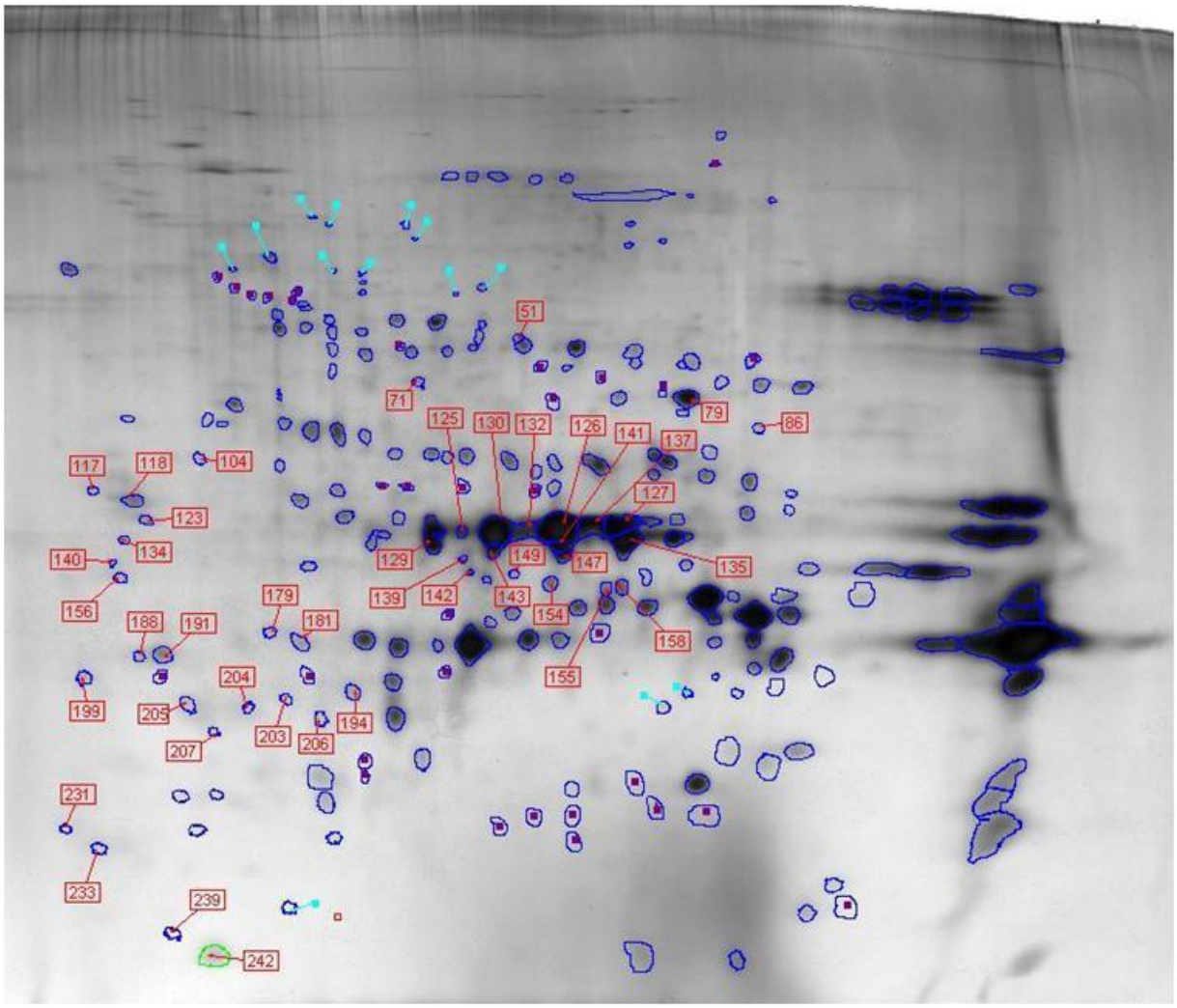
ANNEXE 3

Tableau S3 : Ensemble des protéines de la fraction globuline de la graine entière de *Psychotria douarrei* réparties selon leur classe fonctionnelle.

Globulines *P. douarrei* (graine entière)								
Spot number	NCBI accession number	Protein name	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
71	gi-60417424	alpha galactosidase	*Coffea arabica*	45849	6,33	13	202	4
79	gi-120666	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*Antirrhinum majus*	36662	8,3	4	60	1
86	gi-1346110	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	*Nicotiana tabacum*	35923	6,38	5	70	1
104	gi-2511586	multicatalytic endopeptidase	*Arabidopsis thaliana*	29121	5,03	19	279	5
117	gi-195605696	elongation factor 1-delta 2	*Zea mays*	24863	4,39	16	246	4
118	gi-3912950	14-3-3-like protein E	*Nicotiana tabacum*	30551	4,98	32	480	10
123	gi-5902676	14-3-3-like protein	*Helianthus annuus*	28929	4,65	24	387	7
125	gi-1095144	nuclear matrix endonuclease	*Cucurbita pepo*	31088	4,94	5	68	1
126	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	112	2
127	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	110	2
129	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	3	122	2
130	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	126	2
132	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	81	2
134	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	0	60	1
135	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	136	2
137	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	120	2
139	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	87	2
140	gi-225438418	translation initiation factor 6	*Vitis vinifera*	26473	4,77	11	161	3
141	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	134	2
142	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	112	2
143	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	62	1
147	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	97	2
149	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	66	1
154	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	51	1
155	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	57	1
156	gi-12229923	20S proteasome alpha subunit alpha-6	*Glycine max*	25964	4,7	23	304	6
158	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	99	2
179	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	60	1
181	gi-118482133	unknown	*Populus trichocarpa*	24410	5,93	8	77	2
	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	65	1
194	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	55	1
199	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	60	1
203	gi-242094448	unknown protein	*Sorghum bicolor*	67969	8,18	1	57	1
	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	51	1

Globulines *P. douarrei* (graine entière)								
Spot number	NCBI accession number	Protein name	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
204	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	49	1
205	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	49	1
206	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	71	1
207	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	56	1
231	gi-132270	rubber elongation factor protein	*Hevea brasiliensis*	14713	5,04	7	84	1
233	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	57	1
239	gi-82469930	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	55	1

Figure S3 : Carte protéomique de la fraction globuline de la graine mature sèche de *Psychotria douarrei*

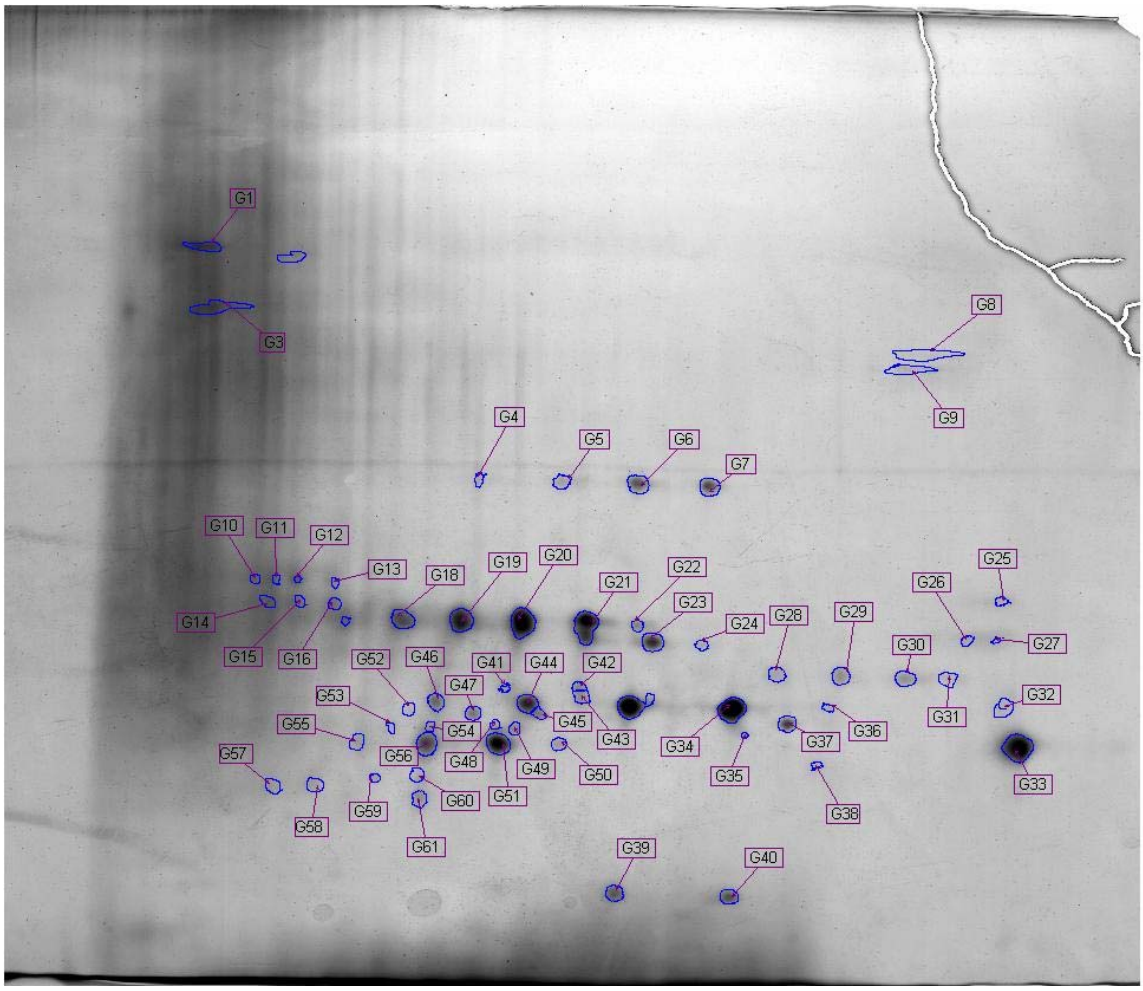


ANNEXE 4

Tableau S4 : Ensemble des protéines de la fraction glutéline de la graine entière de *Psychotria douarrei* réparties selon leur classe fonctionnelle.

Glutelines *P. douarrei* (graine entière)								
Spot number	NCBI accession number	Protein name	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
1	gi-223546830-gb-EEF48327.1-	protein disulfide isomerase	*Ricinus communis*	55475	4,91	6	103	2
3	gi-172046673-sp-P85485.1-UP01_PINHA	unknown	*Pinus halepensis*	1031	4,03	100	60	1
4	gi-157350603-emb-CAO40694.1-	hypothetical protein	*Vitis vinifera*	34891	7,57	3	54	1
5	gi-225439183-ref-XP_002275127.1-	hypothetical protein	*Vitis vinifera*	53159	6,99	2	52	1
6	gi-157350603-emb-CAO40694.1-	hypothetical protein	*Vitis vinifera*	34891	7,57	4	50	1
10	gi-7362753-emb-CAB83123.1-	desiccation-related protein PCC13-62 like	*Arabidopsis thaliana*	34709	5,27	5	87	1
15	gi-30844168-gb-AAP35269.1-	hevein-like antimicrobial peptide	*Euonymus europaeus*	35459	7,77	6	112	1
	gi-7362753-emb-CAB83123.1-	desiccation-related protein PCC13-62 like	*Arabidopsis thaliana*	34709	5,27	5	80	1
16	gi-3551952-gb-AAC34854.1-	aspartic proteinase	*Hemerocallis hybrid cultivar*	55851	6,13	5	72	1
18	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	99	2
19	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	73	1
20	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	40	1
20	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	50	1
23	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	71	1
28	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	53	1
39	gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precur	*Actinidia chinensis*	52954	7,28	2	62	1
40	gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precur	*Actinidia chinensis*	52954	7,28	4	73	1
41	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	73	2
42	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	86	2
43	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	70	2
44	gi-116059075-emb-CAL54782.1-	mitogen-activated protein kinase	*Ostreococcus tauri*	56980	5,61	2	62	1
45	gi-6006619-emb-CAB56851.1-	manganese superoxide dismutase	*Prunus persica*	25439	8,62	17	110	2
47	gi-3719457-gb-AAC63379.1-	manganese superoxide dismutase	*Zantedeschia aethiopica*	26260	6,71	11	117	3
49	REVERSED_gi-148907451-gb-ABR16858.1-	beta-mannosidase	*Picea sitchensis*	46291	6,6	1	50	1
	gi-1755160-gb-AAB51569.1-	germin-like protein	*Arabidopsis thaliana*	21779	5,81	7	48	1
50	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	56	2
51	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	66	1
52	gi-3108345-gb-AAC15806.1-	superoxide dismutase	*Raphanus sativus*	25337	8,77	13	45	1
53	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	48	1
56	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	36	1
58	gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precur	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	52	1

Figure S4 : Carte protéomique de la fraction glutéline de la graine mature sèche de *Psychotria douarrei*

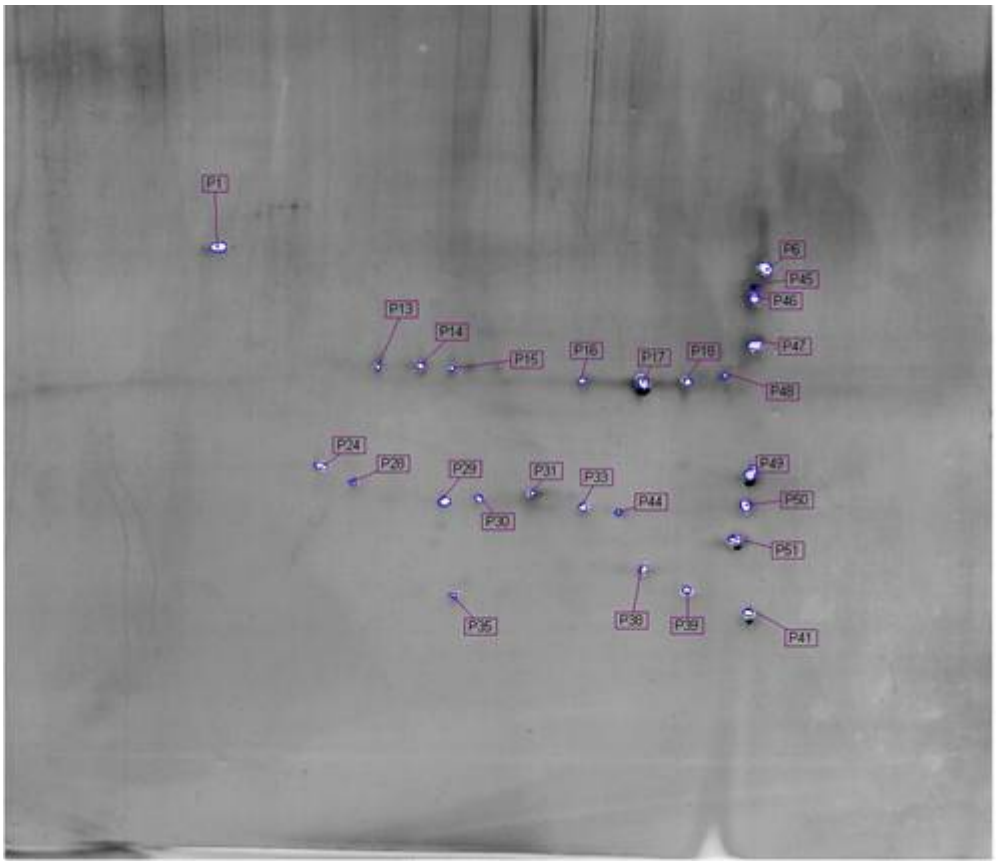


ANNEXE 5

Tableau S5 : Ensemble des protéines de la fraction prolamine de la graine entière de *Psychotria douarrei* réparties selon leur classe fonctionnelle.

Prolamines *P. douarrei* (graine entière)								
Spot	NCBI accession number	Protein name	Organism	theor MM (Da)	theor pI	Covering (% of total protein)	Score (>40)	Nb peptides
6	gi-18339-emb-CAA42843.1-	elongation factor 1A	*Daucus carota*	49271	9,24	13	231	5
13	gi-504489-gb-AAA33022.1-	alpha-galactosidase	*Coffea arabica*	41284	5,6	15	179	3
14	gi-504489-gb-AAA33022.1-	alpha-galactosidase	*Coffea arabica*	41284	5,6	17	202	4
15	gi-504489-gb-AAA33022.1-	alpha-galactosidase	*Coffea arabica*	41284	5,6	18	214	4
24	gi-12323093-gb-AAG51530.1-AC051631_10	desiccation-related protein PCC13-62 like	*Arabidopsis thaliana*	32787	8,27	7	93	1
28	gi-7362753-emb-CAB83123.1-	desiccation-related protein PCC13-62 like	*Arabidopsis thaliana*	34709	5,27	5	74	1
29	gi-3551952-gb-AAC34854.1-	aspartic proteinase	*Hemerocallis hybrid cultivar*	55851	6,13	3	90	2
30	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	48	1
31	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	98	2
33	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	96	2
41	gi-15128437-dbj-BAB62621.1-	40S ribosomal protein S6	*Oryza sativa Japonica Group*	22213	9,74	2	76	1
47	gi-14031049-gb-AAK52084.1-	peroxidase	*Nicotiana tabacum*	39039	5,99	2	169	3
48	gi-20551-emb-CAA42904.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	*Petunia x hybrida*	36504	6,68	8	67	1
49	gi-147789503-emb-CAN67418.1-	hypothetical protein	*Vitis vinifera*	109264	9,01	0	35	1

Figure S5 : Carte protéomique de la fraction prolamine de la graine mature sèche de *Psychotria douarrei*



ANNEXE 6

Tableau S6 : Ensemble des protéines de la fraction albumine de l'embryon de *Psychotria douarrei* réparties selon leur classe fonctionnelle.

Albumines *P. douarrei* (embryon)									
Spot	NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Species	Mass (Da)	pI	Covering (% of total proteins)	Score (>40)	Nb peptides
92	gi-18172-emb-CAA38893.1-	proliferating cell nuclear antigen	Cell growth/division-Cell cycle	*Catharanthus roseus*	29746	4,58	25	122	3
96	gi-113648740-dbj-BAF29252.1-	actin	Cell structure-Cytoskeleton	*Oryza sativa Japonica Group*	39837	5,29	19	301	5
97	gi-113648740-dbj-BAF29252.1-	actin	Cell structure-Cytoskeleton	*Oryza sativa Japonica Group*	39837	5,29	8	108	2
10	gi-223539100-gb-EEF40696.1-	catalase	Disease/Defence-Detoxification	*Ricinus communis*	56975	7,38	23	307	6
13	gi-117067068-gb-ABK32073.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	*Indisponible*	46552	5,33	10	249	5
15	gi-117067068-gb-ABK32073.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	*Acanthus ebracteatus*	46552	5,33	7	195	4
27	gi-157328520-emb-CAO21229.1-	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	*Vitis vinifera*	33094	5,5	24	284	4
29	gi-1926269-emb-CAA72804.1-	peroxiredoxin	Disease/Defence-Detoxification	*Arabidopsis thaliana*	24066	6,13	7	85	2
44	gi-6006619-emb-CAB56851.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	*Prunus persica*	25439	8,62	11	126	2
59	gi-157328520-emb-CAO21229.1-	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	*Vitis vinifera*	33094	5,5	33	487	7
60	gi-2213425-emb-CAB09799.1-	lactoylglutathione lyase	Disease/Defence-Detoxification	*Citrus x paradisi*	32623	5,46	33	509	7
85	gi-6006619-emb-CAB56851.1-	superoxide dismutase (manganese)	Disease/Defence-Detoxification	*Prunus persica*	25439	8,62	17	114	2
89	gi-119367465-gb-ABL67649.1-	thioredoxin-dependent peroxidase	Disease/Defence-Detoxification	*Citrus cv. Shiranuhi*	17329	5,15	20	52	1
90	gi-223548249-gb-EEF49740.1-	superoxide dismutase (cu/zn)	Disease/Defence-Detoxification	*Ricinus communis*	15169	5,64	14	73	2
100	gi-118488230-gb-ABK95934.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	*Populus trichocarpa*	53968	6,9	11	187	3
110	gi-117067068-gb-ABK32073.1-	monodehydroascorbate reductase	Disease/Defence-Detoxification	*Acanthus ebracteatus*	46552	5,33	5	141	2
34 bis	gi-222854318-gb-EEE91865.1-	universal stress protein	Disease/Defence-Stress responses	*Pseudotsuga menziesii*	18597	6,51	6	69	1
45	gi-3269288-emb-CAA19721.1-	benzoquinone reductase	Disease/Defence-Stress responses	*Arabidopsis thaliana*	22298	6,3	7	53	1
74	gi-167962392-dbj-BAG09376.1-	betaine-aldehyde dehydrogenase (peroxisomal)	Disease/Defence-Stress responses	*Glycine max*	54576	5,35	9	195	3
75	gi-167962392-dbj-BAG09376.1-	betaine-aldehyde dehydrogenase (peroxisomal)	Disease/Defence-Stress responses	*Glycine max*	54576	5,35	9	200	3
93	gi-147853192-emb-CAN78553.1-	late embryogenesis abundant protein	Disease/Defence-Stress responses	*Vitis vinifera*	34919	4,67	5	104	2
14	gi-82400134-gb-ABB72806.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Solanum tuberosum*	40690	6,32	5	117	2
16	gi-68138959-gb-AAY86033.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Citrus x paradisi*	41313	5,82	12	156	3
17	gi-6684351-gb-AAF23533.1-AF110435_1	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Capsella rubella*	41105	5,97	10	126	3
18	gi-68138959-gb-AAY86033.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Citrus x paradisi*	41313	5,82	10	236	4
19	gi-68138959-gb-AAY86033.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Citrus x paradisi*	41313	5,82	12	122	2
20	gi-192912998-gb-ACF06607.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Elaeis guineensis*	41015	6,03	13	285	6
30 bis	gi-13958681-gb-AAK50905.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Paeonia peregrina*	22881	6,25	10	72	1
34	gi-13958681-gb-AAK50905.1-	alcohol dehydrogenase	Energy-Fermentation	*Paeonia peregrina*	22881	6,25	10	49	1
5	gi-51340060-gb-AAU00726.1-	phosphoglucose isomerase	Energy-Glycolysis	*Solanum tuberosum*	62833	6,48	10	83	1

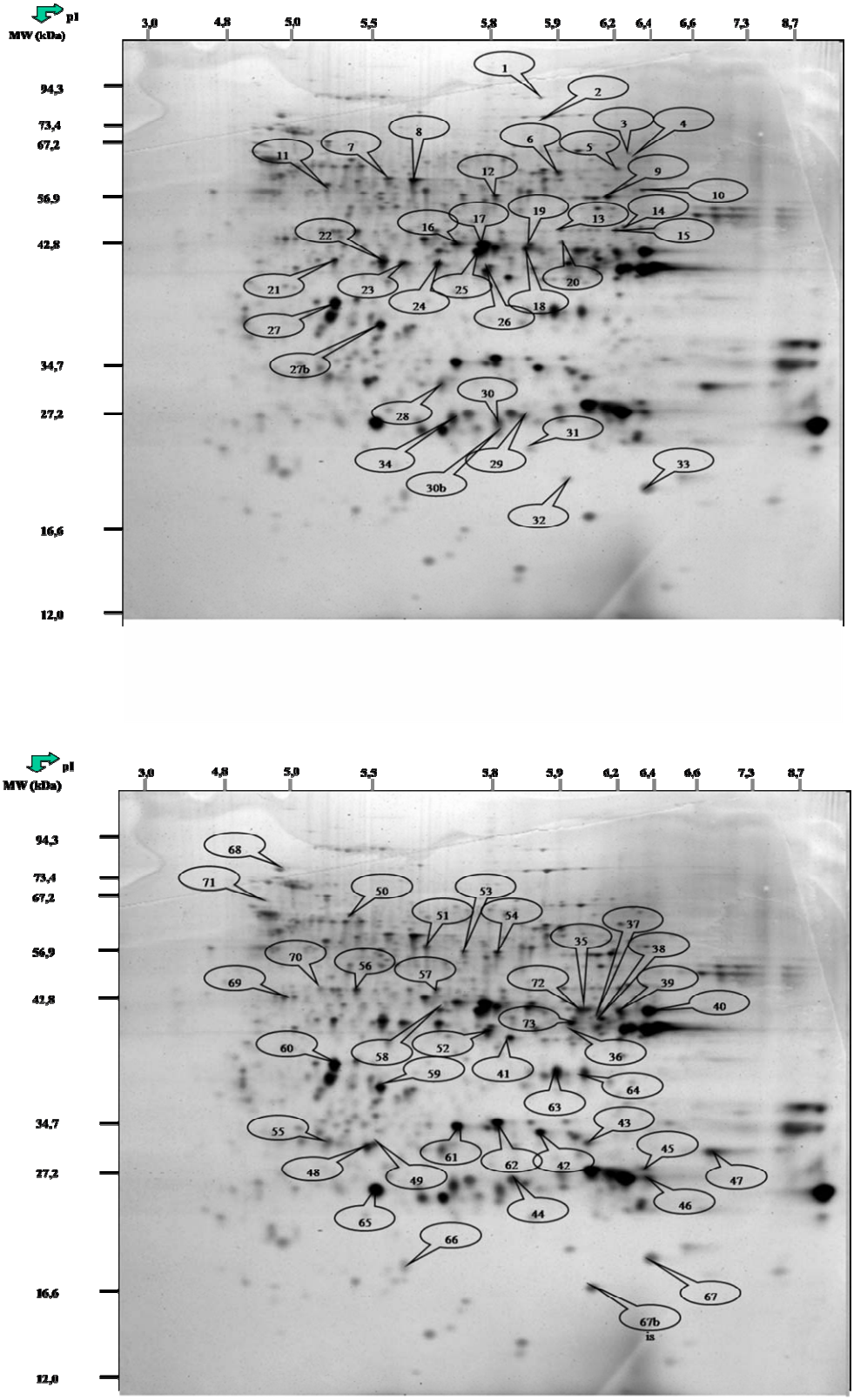
Albumines *P. douarrei* (embryon)									
Spot	NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Species	Mass (Da)	pI	Covering (% of total proteins)	Score (>40)	Nb peptides
35	gi-77999255-gb-ABB16974.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	*Solanum tuberosum*	38413	8,52	15	240	4
37	gi-7529717-emb-CAB86897.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	*Arabidopsis thaliana*	38516	6,05	10	208	3
39	gi-3021338-emb-CAA06308.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	*Cicer arietinum*	38428	6,21	10	238	4
40	gi-77999255-gb-ABB16974.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	*Solanum tuberosum*	38413	8,52	21	242	5
41	gi-3021338-emb-CAA06308.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	*Cicer arietinum*	38428	6,21	4	80	1
43	gi-147784332-emb-CAN70587.1-	triosphosphate isomerase	Energy-Glycolysis	*Vitis vinifera*	27181	6,34	17	268	4
48	gi-76573375-gb-ABA46792.1-	triosphosphate isomerase	Energy-Glycolysis	*Solanum tuberosum*	27694	5,9	22	299	4
53	gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	*Ricinus communis*	47883	5,56	23	404	7
54	gi-433609-emb-CAA82232.1-	enolase	Energy-Glycolysis	*Ricinus communis*	47883	5,56	23	466	8
55	gi-76573375-gb-ABA46792.1-	triosphosphate isomerase	Energy-Glycolysis	*Solanum tuberosum*	27694	5,9	11	140	2
72	gi-21835-emb-CAA33302.1-	3-phosphoglycerate kinase (cytosolic)	Energy-Glycolysis	*Triticum aestivum*	42096	5,64	9	164	2
73	gi-3021338-emb-CAA06308.1-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Energy-Glycolysis	*Cicer arietinum*	38428	6,21	7	182	3
77	gi-34099812-gb-AAQ57193.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	*Panax ginseng*	31792	6,4	18	301	5
78	gi-34099812-gb-AAQ57193.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	*Panax ginseng*	31792	6,4	38	266	5
79	gi-34099812-gb-AAQ57193.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	*Panax ginseng*	31792	6,4	32	344	6
80	gi-166706-gb-AAA32794.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	*Arabidopsis thaliana*	36963	6,34	7	96	1
81	gi-74419004-gb-ABA03227.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	*Populus maximowiczii x Populus nigra*	37070	7,67	6	55	1
82	gi-74419004-gb-ABA03227.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	*Populus maximowiczii x Populus nigra*	37070	7,67	6	65	1
83	gi-74419004-gb-ABA03227.1-	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Energy-Glycolysis	*Populus maximowiczii x Populus nigra*	37070	7,67	10	65	1
123	gi-192910674-gb-ACF06445.1-	triosphosphate isomerase	Energy-Glycolysis	*Elaeis guineensis*	27248	5,87	28	233	3
126	gi-136057-sp-P21820.1-TPIS_COPJA	triosphosphate isomerase	Energy-Glycolysis	*Coptis japonica*	27073	5,54	7	92	1
9	gi-2529229-dbj-BAA22812.1-	6-phosphogluconate dehydrogenase	Energy-Pentoses phosphates	*Glycine max*	56338	5,55	18	533	10
69	gi-2078350-gb-AAB54016.1-	transaldolase	Energy-Pentoses phosphates	*Solanum tuberosum*	47779	5,79	20	300	5
95	gi-222875454-gb-ACM68927.1-	6-phosphogluconate dehydrogenase	Energy-Pentoses phosphates	*Cucumis sativus*	54051	5,77	13	255	5
108	gi-223548639-gb-EEF50130.1-	transaldolase	Energy-Pentoses phosphates	*Ricinus communis*	47783	5,5	14	229	3

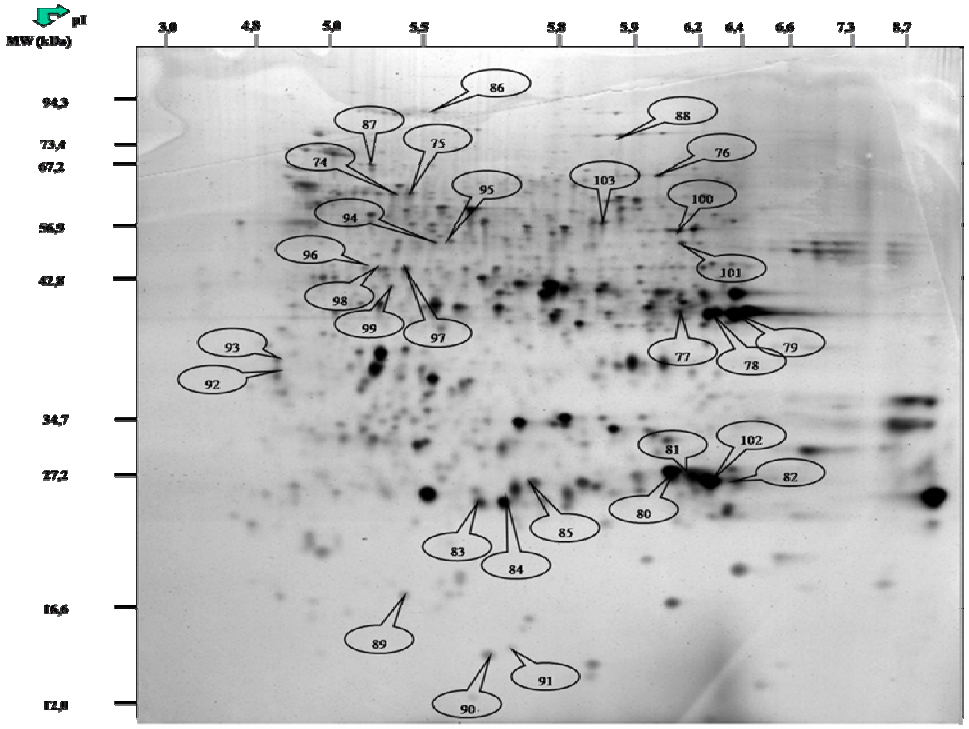
Albumines *P. douarrei* (embryon)									
Spot	NCBI accession N°	Protein name	Function category-Function description	Species	Mass (Da)	pI	Covering (% of total proteins)	Score (>40)	Nb peptides
23	gi-8843886-dbj-BAA97412.1-	malate dehydrogenase (cytosolic)	Energy-TCA pathway	*Arabidopsis thaliana*	35652	6,33	25	213	4
24	gi-8843886-dbj-BAA97412.1-	malate dehydrogenase (cytosolic)	Energy-TCA pathway	*Arabidopsis thaliana*	35652	6,33	16	243	4
76	gi-8778521-gb-AAF79529.1-AC023673_17	dihydrolipoamide dehydrogenase	Energy-TCA pathway	*Arabidopsis thaliana*	53752	6,96	17	333	5
98	gi-222850876-gb-EEE88423.1-	malate dehydrogenase	Energy-TCA pathway	*Populus trichocarpa*	48270	6,23	14	204	5
101	gi-1556429-emb-CAA59008.1-	citrate synthase	Energy-TCA pathway	*Nicotiana tabacum*	52459	7,7	19	347	5
2	gi-8439545-gb-AAF74983.1-AF082893_1	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	*Solanum tuberosum*	84613	5,93	13	518	7
3	gi-974782-emb-CAA89019.1-	methionine synthase (cobalamine-independent)	Metabolism-Amino acids	*Solenostemon scutellarioides*	86717	6,17	1	83	1
6	gi-55297085-dbj-BAD68706.1-	acetohydroxy-acid reductoisomerase	Metabolism-Amino acids	*Oryza sativa Japonica Group*	59644	5,73	9	278	5
12	gi-223537310-gb-EEF38941.1-	histidinol dehydrogenase	Metabolism-Amino acids	*Ricinus communis*	52027	5,78	12	229	4
51	gi-1724102-gb-AAB38499.1-	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	Metabolism-Amino acids	*Mesembryanthemum crystallinum*	53144	5,75	20	332	6
88	gi-8439545-gb-AAF74983.1-AF082893_1	methionine synthase	Metabolism-Amino acids	*Solanum tuberosum*	84613	5,93	7	169	2
104	gi-18462-emb-CAA40420.1-	pyruvate, orthophosphate dikinase	Metabolism-Amino acids	*Flaveria trinervia*	103883	5,69	4	119	3
106	gi-37953301-gb-AAR05449.1-	alanine aminotransferase	Metabolism-Amino acids	*Capsicum annuum*	52760	5,29	12	285	5
107	gi-37953301-gb-AAR05449.1-	alanine aminotransferase	Metabolism-Amino acids	*Capsicum annuum*	52760	5,29	16	361	7
27 bis	gi-118486174-gb-ABK94930.1-	thiazole biosynthetic enzyme	Metabolism-Cofactors	*Populus trichocarpa*	37858	5,78	27	405	5
102	gi-225451968-ref-XP_002279750.1-	allene oxide cyclase	Metabolism-Cofactors	*Vitis vinifera*	27577	9,14	11	121	2
124	gi-118486174-gb-ABK94930.1-	thaizole biosynthetic enzmye	Metabolism-Cofactors	*Populus trichocarpa*	37858	5,78	10	246	3
99	gi-50725401-dbj-BAD32875.1-	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	Metabolism-Lipids and sterols	*Oryza sativa Japonica Group*	46854	6,48	7	202	3
7	gi-1212996-emb-CAA62689.1-	UDP-glucose pyrophosphorylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	*Hordeum vulgare*	51612	5,2	18	360	6
8	gi-6625908-gb-AAF19422.1-AF203909_1	UDP-glucose pyrophosphorylase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	*Musa acuminata*	51330	5,48	21	603	9
	gi-223529972-gb-EEF31898.1-	aldose-1-epimerase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	*Ricinus communis*	37030	6,06	6	52	1
103	gi-223547851-gb-EEF49343.1-	alpha-mannosidase	Metabolism-Sugars and polysaccharides	*Ricinus communis*	109909	5,83	4	181	3
50	gi-92882356-gb-ABE86687.1-	chaperonin (GroEL-like)	Protein destination and storage-Folding and stability	*Medicago truncatula*	61074	6,27	22	603	10
71	gi-223546830-gb-EEF48327.1-	protein disulphide isomerase	Protein destination and storage-Folding and stability	*Ricinus communis*	55475	4,91	7	149	2

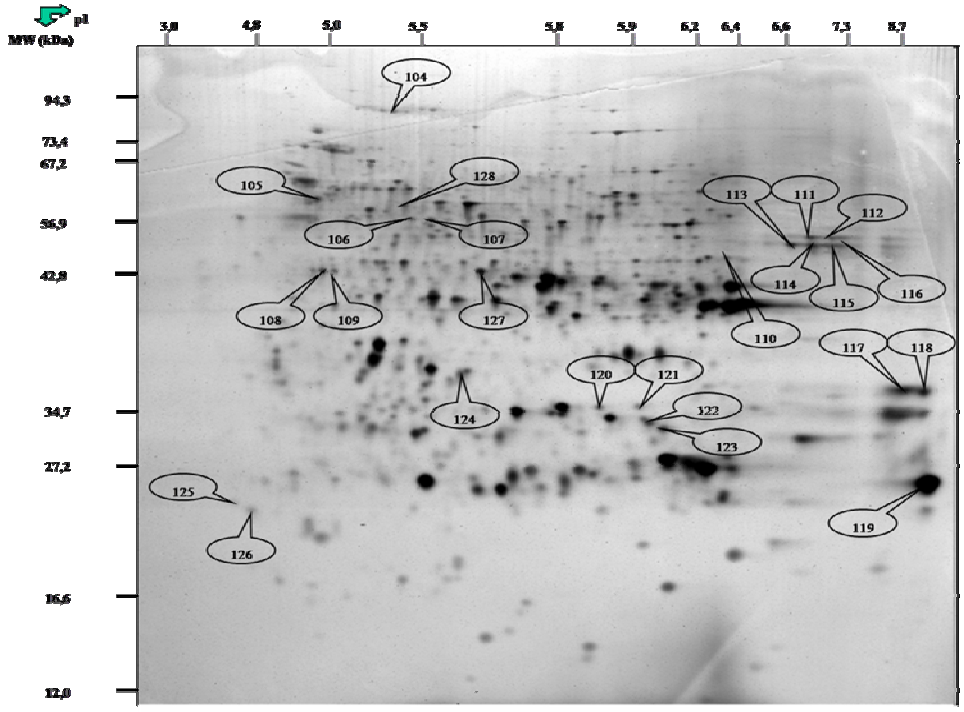
Albumines *P. douarrei* (embryon)									
Spot	**NCBI accession N°**	**Protein name**	**Function category-Function description**	**Species**	**Mass (Da)**	**pI**	**Covering (% of total proteins)**	**Score (>40)**	**Nb peptides**
21	gi-226821165-gb-ACO82274.1-	o-sialoglycoprotein endopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	*Capsella grandiflora*	26788	4,91	11	109	2
25	gi-147810055-emb-CAN78278.1-	serpin / serine protease inhibitor	Protein destination and storage-Proteolysis	*Vitis vinifera*	41988	5,66	5	130	2
26	gi-147810055-emb-CAN78278.1-	serpin / serine protease inhibitor	Protein destination and storage-Proteolysis	*Vitis vinifera*	41988	5,66	8	126	2
56	gi-222848218-gb-EEE85765.1-	protease C56	Protein destination and storage-Proteolysis	*Populus trichocarpa*	42511	5,87	8	60	2
58	gi-147810055-emb-CAN78278.1-	serpin-like protein	Protein destination and storage-Proteolysis	*Vitis vinifera*	41988	5,66	8	129	2
128	gi-157343187-emb-CAO66676.1-	leucine aminopeptidase	Protein destination and storage-Proteolysis	*Vitis vinifera*	60704	6,69	7	296	4
33	gi-793854-emb-CAA57846.1-	legumin precursor	Protein destination and storage-Storage proteins	*Magnolia salicifolia*	52954	7,28	2	55	1
36	gi-223529302-gb-EEF31271.1-	cupin family protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Ricinus communis*	38947	6,97	9	162	4
42	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	123	2
57	gi-222850981-gb-EEE88528.1-	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Storage proteins	*Populus trichocarpa*	71221	5,14	10	368	5
61	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	121	2
62	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	97	2
66	gi-11990130-emb-CAB55634.2-	17.9 kDa heat-shock protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Helianthus annuus*	17894	5,84	18	105	2
68	gi-6746592-gb-AAF27639.1-AF217459_1	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Storage proteins	*Arabidopsis thaliana*	77059	5,13	5	127	3
84	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	71	1
87	gi-223542544-gb-EEF44084.1-	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Storage proteins	*Ricinus communis*	71076	6,1	14	189	4
120	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	90	2
121	gi-82469930-gb-ABB77213.1-	11S globulin-like protein	Protein destination and storage-Storage proteins	*Actinidia chinensis*	52515	7,63	2	64	1
125	gi-222850981-gb-EEE88528.1-	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Storage proteins	*Populus trichocarpa*	71221	5,14	6	160	2
127	gi-157344266-emb-CAO69199.1-	heat shock protein (HSP70)	Protein destination and storage-Storage proteins	*Vitis vinifera*	71126	5,17	12	401	5
52	gi-218187401-gb-EEC69828.1-	ATP-dependent RNA helicase	Protein synthesis-Others	*Oryza sativa Japonica Group*	186520	9,26	2	94	3
1	gi-225462164-ref-XP_002266780.1-	elongation factor 2	Protein synthesis-Translation factors	*Vitis vinifera*	93918	5,8	6	283	5
122	gi-395072-emb-CAA80845.1-	guanine nucleotide regulatory protein	Signal transduction	*Vicia faba*	25274	6,39	25	247	5
11	gi-18831-emb-CAA41401.1-	ATP synthase (mitochondrial, beta-subunit)	Transporters-Transport ATPases	*Hevea brasiliensis*	60221	5,95	25	301	6

Albumines *P. douarrei* (embryon)									
Spot	**NCBI accession N°**	**Protein name**	**Function category-Function description**	**Species**	**Mass (Da)**	**pI**	**Covering (% of total proteins)**	**Score (>40)**	**Nb peptides**
63	gi-9622153-gb-AAF89645.1-AF169018_1	short-chain dehydrogenase/reductase	unclear	*Glycine max*	31747	6,6	13	130	2
64	gi-9622153-gb-AAF89645.1-AF169018_1	seed maturation protein PM34	unclear	*Glycine max*	31747	6,6	4	87	1

Figure S6 : Carte protéomique de la fraction albumine de l'embryon de *Psychotria douarrei*




pI
MW (kDa)
3,8
4,8
5,8
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,8
86
87
75
74
88
76
103
95
100
94
96
101
98
99
97
93
92
77
78
79
102
81
82
80
85
83
84
89
91
90


pI
MW (kDa)
3,8
4,8
5,8
5,5
5,8
5,9
6,2
6,4
6,6
7,3
8,7
94,3
73,4
67,2
56,9
42,8
34,7
27,2
16,6
12,0
104
105
128
113
111
112
106
107
114
115
116
108
109
127
110
117
118
120
121
124
122
123
125
126
119

Résumé

La Nouvelle-Calédonie est dotée d'une biodiversité exceptionnelle qui la classe parmi les premiers « hotspots » mondiaux. Son origine est en partie la résultante de la mise en place sur plus d'un tiers de la superficie totale du territoire de sols issus de roches ultramafiques caractérisés par un syndrome dit « serpentinique » : taux importants en métaux lourds toxiques (Ni, Co, Mn, Cr…), faiblesse en éléments nutritifs essentiels (Ca, K, P, N). Ces caractéristiques ajoutées aux conditions climatiques drastiques (températures élevées, précipitations sporadiques) ont conduit à la mise en place d'une flore extrême et unique (88,8% d'endémicité). Les espèces qui la constituent ont dû développer des mécanismes adaptatifs en réponse à ces exigences. Ainsi, la Nouvelle-Calédonie détient une grande diversité d'espèces hyper-accumulatrices de nickel présentes sur ce type de sols. Ces derniers sont l'objet d'exploitations minières de plus en plus importante et qui conduisent à une dégradation rapide des sols et des écosystèmes. Des programmes de restauration écologique sont développés et l'utilisation de plantes pionnières est requise afin d'amorcer la reconstitution du couvert d'origine. Cependant, les connaissances sur la biologie des semences des espèces endémiques de ces milieux apparaissaient pauvres. Des travaux ont donc été engagés afin de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu.

D'une part, dans un souci de restauration écologique, des études sur la structure et l'ultrastructure des graines, la composition biochimique des réserves séminales, les conditions optimums de germination et de conservation de 45 espèces évoluant en milieu ultramafique ont été menées. Elles ont permis de caractériser de manière approfondie les dormances, les moyens de les lever ainsi que leur origine pour certaines de ces espèces. L'analyse biochimique des réserves a révélé une tendance à la présence majoritaire de lipides dont les acides gras constitutifs sont majoritairement insaturés avec les conséquences que cela implique quant à la conservation de ces semences déterminées comme orthodoxes. Plus encore, l'occurrence chez certaines espèces de séries d'acides gras de type ω5 laisse présager leur valorisation potentielle. Enfin, deux stratégies évolutives d'adaptation déployées par les graines de ces 45 espèces issues majoritairement du maquis minier semblent se dégager de la synthèse de l'ensemble des données obtenues.

D'autre part, dans un souci de compréhension des mécanismes de résistance au nickel développé par les graines de *Psychotria douarrei*, hyperaccumulatrice de nickel, une étude écophysiologique sur la structure, la germination et la dormance de ces graines a été menée et a montré une dormance induite par les téguments. Dans le même objectif, une étude par microscope électronique à balayage sur la répartition des éléments minéraux au sein de la graine a également été conduite. Cette dernière a montré la présence d'un gradient de nickel de l'extérieur vers l'intérieur du fruit et de la graine où est localisé l'embryon, le protégeant ainsi de l'effet toxique du nickel. A l'échelle de la graine, cet élément est localisé dans la partie la plus externe de l'albumen en relation étroite avec le phosphore par opposition à la partie la plus interne constituée majoritairement de cristaux d'oxalate de calcium. Cette étude a également montré la présence originale de cristaux de sel de nickel au sein du fruit et de la semence. Une étude protéomique sur ces mêmes graines a révélé la présence en quantité importante de protéine de type DING jouant un rôle potentiel majeur (transporteur de type ABC) dans la mise en place d'un mécanisme de tolérance au nickel nouvellement décrit au niveau des graines et un rôle tout aussi important dans la germination (Germin-like binding protéine) en relation avec la concentration de l'oxalate de calcium. Un mécanisme potentiel concernant la tolérance au nickel est ainsi proposé.

Mots clés : Nouvelle-Calédonie, Restauration écologique, Ecologie des graines, Ultramafique, Adaptation, *Psychotria douarrei*, Mécanisme d'hyperaccumulation, Protéomique, Nickel.

Abstract

New Caledonia is well known for its exceptional floristic biodiversity, which places the island as one of world's the first « hotspots ». The presence of this particular flora is due to the occurrence, on over one third of the total area, of soils derived from ultramafic rocks. The latter present a so-called "serpentinic" syndrome, i.e. high levels of toxic heavy metals (Ni, Co, Mn, Cr…) together with poverty in essential nutrients (Ca, K, P, N). Such characteristics associated with drastic climatic conditions (high temperature, sporadic precipitations) have led to the development of a unique and rich flora (88.8% of endemicity). Plant species have obviously developed adaptive mechanisms in response to the severe environmental conditions. Thus, New Caledonian ultramafic soils display an important diversity of Ni-hyperaccumulator species. These are affected by the constant increase of Ni exploitation, which is leading to a rapid degradation of soils and ecosystems. Ecological restoration programs using pioneer native species reveal to be a necessity for the enhancement of the ecological successions. Unfortunately, knowledge on native species' seed biology still appears to be quite poor. Part of this work has thus been engaged in order to better understand adaptive mechanisms of native plants.

On one hand, in the aim to propose better ecological restoration methods, analysis of seed structure and ultrastructure; seed storage reserve biochemical composition; optimal germination and conservation conditions of 45 species, involved on ultramafic environment, have been carried out. These studies have enabled to better define dormancy of such seeds, to find ways to break dormancies, but also dormancy origin, for some of the species. Biochemical analyses showed lipids are generally the major seed storage reserve form. These lipids are predominantly composed of unsaturated fatty acids, with the consequence induced for the storage conditions of the seeds determined as orthodox. Moreover, the occurrence of a series of ω5 fatty acids, in some species, suggests they could have interesting industrial applications. Finally, a synthesis of our results on the 45 studied species (mainly belonging to the "maquis minier" floristic cortege) reveals seeds seem to have developed two kinds of adaptive evolution strategies.

On the another hand, in the aim to understand nickel tolerance mechanisms developed by the seeds of a nickel hyperaccumulator plant, *Psychotria douarrei*, an ecophysiological study of their structure, germination and dormancy has been carried out. The results show dormancy is induced by the seed coat. Still in the same objective, a scanning electron microscopy analysis of mineral distribution within the seeds was also carried out. Data revealed the existence of a nickel gradient from the outside to the inside of the fruit and the seed, which contains the embryo. It thus may be hypothesized the embryo is protected from the toxic effect of nickel, thanks to such a gradient system. When focusing on the whole seed, Ni appears to be localised on the external part of the endosperm, in direct relation with phosphorous. On the contrary, the internal part is predominantly constituted by calcium oxalate crystals. This study has also revealed an original occurrence of nickel salt crystals in the fruit and seed. A proteomic study on *P. douarrei* seeds has highlighted the presence of an important quantity of proteins belonging to the DING protein family. We suggest that they could play a major role (ABC transports protein system) in a nickel tolerance mechanism, described for the first time in seeds. They may also play an important role in the germination (Germin-like binding protein) in relation with the calcium oxalate. A potential mechanism concerning nickel tolerance is thus proposed.

Key Words: New Caledonia, Ecological restoration, Seed Ecology, Ultramafic, Adaptation, *Psychotria douarrei*, Hyperaccumulation mechanism, Proteomics, Nickel.